

SIGNAL-TRANSDUKTIONSMECHANISMEN IN DER REGULATION DER PROENKEPHALIN GENEXPRESSION

Nikolai A. Kley

Disbui. München

1989

SIGNAL-TRANSDUKTIONSMechanismen in der Regulation
der Proenkephalin Genexpression

D i s s e r t a t i o n

der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von:
Nikolai A. Kley

1. Berichterstatter: Prof.Dr. A. Herz

2. Berichterstatter: Prof.Dr. E.L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.88

	Seite
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	2
Zusammenfassung	5
<u>I. Einleitung</u>	9
<u>II. Material und Methoden</u>	17
II.1. Primärkulturen von chromaffinen Zellen des Rindes: Anlage der Zellkulturen	17
II.2. Extraktion von Ribonukleinsäuren	19
II.2.1. Extraktion aus chromaffinen Zellen	19
II.2.2. Extraktion aus Gewebe	20
II.2.2.1. Extraktion der Gesamt-RNA	20
- Phenolextraktion	20
- Guanidinium/Cäsiumchlorid Methode	20
II.2.2.2. Isolierung von mRNA	21
II.3 Nukleinsäurehybridisierung	22
II.3.1. "Northern Blot" Analyse	22
II.3.2. Hybridisierung in Lösung	23
- Prinzip	23
- Vorversuche zur Optimierung der Reaktion	25
- Durchführung	27
II.3.3. In situ Hybridisierung	27
II.4. Synthese von radioaktiven Sonden	28
II.4.1. Plasmidextraktion	29
II.4.2. Subklonierung von DNA-Fragmenten in M13 Phagen	31

- Ligierung von Fragmenten
- Herstellung von kompetenten Zellen
- Transformation
- Ausplattierung und Selektion positiver Klone
- Isolierung des einzelsträngigen Phagen

II.4.3. Synthese einzelsträngiger cDNA Sonden

II.5. Radioimmunoassay

II.5.1. "Solid-Phase-RIA" mit monoklonalem Antikörper

II.5.2. cAMP RIA

II.5.3. Immunohistochemie mit monoklonalem Antikörper

II.6. Bestimmung von Inositphosphaten

II.7. Messung von Ca^{2+} -Aufnahme mittels $^{45}\text{Ca}^{2+}$

II.8. Materialien

III. Ergebnisse und Diskussion

III.1. Subklonierung von Proenkephalin-Fragmenten in M13

III.2. Elektrische Aktivität und Genexpression

- Einleitung
- Ergebnisse
- Diskussion

III.3. Rezeptor und "second messenger"-regulierte Ionenkanäle in der Modulation der PENK-Genexpression

- Einleitung
- Ergebnisse
- Diskussion

	Seite
III.4. Der Histaminrezeptor und das Phosphatidylinosit System in der Regulation der PENK Genexpression	60
- Einleitung	60
- Ergebnisse	63
- Diskussion	64
III.5. Multiple Regulation der PENK-Genexpression durch die Proteinkinase C	66
-Einleitung	66
-Ergebnisse	69
-Diskussion	73
III.6. Abhängigkeit der Proenkephalin-Induktion von der Proteinsynthese	77
IV. <u>Allgemeine Zusammenfassung und Diskussion</u>	78
V. <u>Literaturverzeichnis</u>	82

ZUSAMMENFASSUNG

Ein cDNA-Fragment, komplementär zu Proenkephalin (PENK) mRNA, wurde von einem PBR322-Plasmid in einen M13 (mp8)-Vektor subkloniert. Mittels des rekombinanten M13-Vektors konnte eine einzelsträngige cDNA-Sonde hoher spezifischer Aktivität hergestellt werden. Diese cDNA-Sonde wurde zur Charakterisierung der PENK-mRNA mittels "Northern Blot" und einer Methode der Hybridisierung in Lösung verwendet. Mit Hilfe dieser Meßtechniken wurden am Modell der Primärkultur von chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks des Rindes die Mechanismen der synaptischen Regulation der Genexpression des Proenkephalins untersucht. Depolarisierung der chromaffinen Zellen durch Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration (5-25 mM) führte zu einer Stimulierung der PENK-mRNA Spiegel. Der K^+ -induzierte Anstieg der PENK-mRNA war mit einer erhöhten Synthese und Freisetzung von PENK-abstammenden Opioidpeptiden verbunden. Ebenso induzierten die depolarisierenden Agentien Barium (1 mM) und Veratridin (5 μ M) einen starken Anstieg der PENK-mRNA Spiegel. Die Stimulierung der PENK-mRNA durch Veratridin war mit einer erhöhten Synthese von PENK-mRNA Vorläufern verbunden, was auf eine erhöhte Transkription des PENK-Gens vermuten läßt. Mittels Pharmaka und Toxinen, die eine Modulation der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanalaktivität bewirken, konnte gezeigt werden, daß die K^+ -, Ba^{2+} - und Veratridin medierte Induktion der PENK-mRNA über eine Aktivierung potentialabhängiger Na^+ - und/oder Ca^{2+} -Kanäle läuft. Inkubation der Zellen mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 bewirkte eine Steigerung der PENK-mRNA Spiegel, was vermuten läßt, daß Ca^{2+} in der Regulation der PENK-

mRNA Expression durch Depolarisierung als sekundärer Mediator fungiert.

Potentialabhängige Na^+ - und/oder Ca^{2+} -Kanäle spielen ebenfalls eine Rolle als Signalübertragungssysteme in rezeptor- und cAMP-abhängigen Modulationen der PENK-mRNA Expression. Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors durch Nikotin, und eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel durch Aktivierung der Adenylatzyklase, sowie Inkubation mit dem cAMP Analog 8BrcAMP, führten zu einem starken Anstieg der PENK-mRNA. Der Nikotin-induzierte Anstieg wurde durch Ca^{2+} -Kanalblocker reduziert, der cAMP-abhängige Anstieg sowohl durch Na^+ - als auch Ca^{2+} -Kanalblocker. Im Gegensatz zum nikotinischen Effekt erscheint die Ca^{2+} -Kanal-Abhängigkeit des cAMP-vermittelten Anstiegs der PENK-mRNA eine Funktion der Zeit zu sein. Aufgrund der unterschiedlichen Regulationsmechanismen der PENK-mRNA durch Nikotin und cAMP, und dem Befund daß ein erhöhter Einstrom an Ca^{2+} nicht zu einer Veränderung intrazellulärer cAMP-Spiegel führt, ist zu vermuten, daß das Adenylatzyklase-System keine primäre Rolle als Signalübertragungssystem in der nikotinischen Induktion der PENK-mRNA spielt.

Untersuchungen zur Funktion des histaminergen H_1 -Rezeptors auf den chromaffinen Zellen deuten darauf hin, daß auch Ionenkanal- und cAMP-unabhängige Mechanismen die PENK-Genexpression regulieren. Der Anstieg der PENK-mRNA-Spiegel durch H_1 -Rezeptor-Aktivierung war im Gegensatz zur nikotinischen Induktion nur partiell von der Modulation potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle abhängig. Aktivierung des H_1 -Rezeptors bewirkte, zusätzlich zur Erhöhung der Ca^{2+} -Kanalaktivität, eine starke Hydrolyse von Phosphoinositlipiden, was zu einer

Synthese von Inositolphosphaten und Diacylglycerin führt. Untersuchungen zur Rolle der Protein-Kinase C (Ca^{2+} / phospholipid-abhängige Proteinkinase) deuten in der Tat auf eine mögliche Rolle des Phosphotidylinosit-Systems in der H_1 -rezeptor-vermittelten Regulation der PENK-Genexpression hin.

Aktivierung dieses Enzyms durch tumor-induzierende Phorbolster und dem synthetischen Diacylglycerin OAG (1-Oleoyl-2-azetyl-glycerin), führten zu einer starken Steigerung der PENK-mRNA-Spiegel. Der Phorbolster-Effekt wurde weiter durch niedrige Konzentrationen von dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 potenziert. Dieser Befund läßt vermuten, daß Ca^{2+} über eine Interaktion mit der Proteinkinase C die PENK-mRNA Expression regulieren kann. Weitere Untersuchungen deuten auf zusätzliche regulatorische Funktionen der Proteinkinase C: 1) In depolarisierten Zellen führte die Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolster zu einer Inhibition der PENK-mRNA Expression. In diesem Fall ist die Modulation der PENK-mRNA durch die Proteinkinase C das Resultat zweier entgegengesetzter Wirkungen, die von der Aktivität der Zellen bestimmt werden: a) eine potente inhibitorische Wirkung, die auf eine Inhibition des Ca^{2+} -Kanals zurückzuführen ist, b) eine stimulatorische Wirkung (s.o.), die unabhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom durch potentialabhängige Ca^{2+} -Kanäle ist. 2) Inkubation der chromaffinen Zellen mit Phorbolster führte zu einer Blockierung der Histamin-stimulierten Phospholipase C - Aktivität und PENK-mRNA-Expression.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Proteinkinase C mit verschiedenen rezeptor-gekoppelten Signalübertragungssystemen interagieren kann, und als positiver- und "negativer-feedback"-Regulator

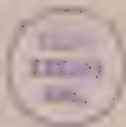
in der PENK-Genexpression involviert sein kann.

EINLEITUNG

Die funktionelle Grundlage der Informationsverarbeitung im Nervensystem liegt in der Eigenschaft neuronaler Zellen, externe und interne Reize in Form elektrischer und chemischer Signale zu speichern und weiterzuleiten. Führt ein Reiz zu einer Veränderung der Membranpermeabilität eines Neurons, so entsteht ein Aktionspotential, das an der Nervenzelle weitergeleitet wird und an der nächsten Synapse zur Freisetzung von gespeichertem Transmitter(n) führt. Durch Interaktion des freigesetzten Transmitters im synaptischen Spalt mit einem Rezeptor auf der Membrane einer postsynaptischen Zelle wird das Signal auf diese Zelle übertragen. In den letzten Jahren wurde deutlich, daß durch Aktivierung von spezifischen Rezeptoren, klassische Transmitter (z.B. biogene Amine, Aminosäuren) und neuronale Peptide über eine Vielfalt von intrazellulären Mechanismen zu chemischen und elektrischen Veränderungen in der postsynaptischen Zelle führen:

- durch Aktivierung von Rezeptoren, die selbst Ionenkanäle sind (z.B. nikotinischer Azetylcholinrezeptor, GABA_A-rezeptor)
- durch Aktivierung von Rezeptoren, die durch transduzierende GTP-bindende Proteine zu
 - a) Ionenkanälen,
 - b) den Adenylatzyklase- und Guanylatzyklase-Systemen,
 - c) dem Phospholipase C-System,

gekoppelt sind.



Diese verschiedenen Systeme ermöglichen, daß ein-und derselbe Transmitter durch Interaktion mit Rezeptoren unterschiedlichen Phänotypen in derselben oder in verschiedenen Zellen, unterschiedliche Funktionen steuern kann.

Phänomene wie die unterschiedlichen Signal-Transduktionsmechanismen, sowie die unterschiedlichen Rezeptorphänotypen, die Anzahl unterschiedlicher Neurotransmitter, Zelltypen und ihren Verknüpfungen, orts- und zeitabhängigen Schwankungen in der Freisetzung von neuroaktiven Substanzen; alle diese Phänomene tragen zur extremen Variabilität und Plastizität der synaptischen Kommunikation zwischen Neuronen bei.

Neurotransmitter bewirken jedoch auch Langzeit-Veränderungen in den Eigenschaften neuronaler und anderer post-synaptischer Zellen. Diese laufen im Gegensatz zu den kurzzeitigen Veränderungen der elektrischen Aktivität und Transmitterfreisetzung, die über posttranslationale Veränderungen zellulärer Proteine vermittelt werden (Schwartz and Greengard, 1987), über eine Modulation der Genexpression ab. Solche Langzeit-Veränderungen wären z.B.:

- die Synthese von Neuropeptiden und Neurotransmitter-synthetisierenden Enzymen (z.B. Tyrosinhydroxylase)
- Synthese von Ionenkanälen, oder regulatorischen Proteinen, die die Aktivität von Ionenkanälen regulieren. Untersuchungen z.B. an Neuronen von Aplysia, haben gezeigt, daß ein und derselbe Reiz (Aktivierung des Serotoninrezeptors) eine kurzzeitige Modulation der elektrischen Aktivität, die unabhängig von der Proteinsynthese ist, und eine langzeitige Veränderung (> 24 Std.) der elektrischen Aktivität, welche von

der Proteinsynthese abhängig ist, einleiten kann (Dale et al., 1987). Diese plastischen Veränderungen scheinen eine kritische Rolle beim Verhalten und Lernvermögen von *Aplysia* zu haben.

Diese verschiedenen Regulationsmechanismen (kurz- und langfristig) neuronaler Aktivität (elektrische Aktivität und Transmitterbiosynthese) könnten als molekulare Analoga einer kurzzeitigen und mittelfristigen (intermediären) Informationsspeicherung gesehen werden (Black et al., 1987). Lernprozesse setzen eine stabile Veränderung im elektrophysiologischen Verhalten von Neuronen voraus und wie eine Reihe von Untersuchungen gezeigt haben, sind diese auch durch Proteinsyntheseblocker beeinflussbar (Goelet et al., 1986; Montarolo et al., 1986; Flexner et al., 1963).

Diese funktions-abhängige Adaptation neuronaler Zellen verleiht dem Nervensystem einen extrem hohen Grad an Plastizität und Funktionskapazität. Die Existenz funktionsabhängiger Veränderungen der Genexpression ist wohl bekannt, die ihnen unterliegenden Mechanismen noch zu ergründen. Zur Charakterisierung dieser Mechanismen ist es nötig reduktionäre, experimentelle Schritte anzunehmen und mit einfachen Modellen zu arbeiten. Das periphere sympathische Nervensystem ist ein vielverwendetes Modell. Für das sympatho-adrenale System konnte gezeigt werden, daß "In-Vivo" und in Organkulturen, prä-synaptische Impulse die Synthese von Peptiden und Katecholaminsynthetisierenden Enzymen in postsynaptischen Zellen verändern. Dieses Phänomen wurde als "trans-synaptische"-Induktion bezeichnet (Thoenen, 1972).

Es ist bekannt, daß die präganglionäre Aktivität die Synthese der Tyrosinhydroxylase und Opioidpeptiden in den postsynaptischen

chromaffinen Zellen über eine Stimulierung der mRNA-Spiegel erhöht. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen an anderen Systemen, in denen die Koppelung von Stimulus mit Biosynthese über eine Modulation der Transkription oder der mRNA-Stabilität läuft (Habener 1981; Schwartz und Costa, 1986; Eberwine und Roberts, 1984; Uhl et al., 1985; Loeffler et al., 1985; Loeffler et al., 1986). Messungen der mRNA-Spiegel lassen daher auf den Grad der funktionellen Aktivität eines Neurons schließen. Weniger bekannt hingegen sind die biochemischen Mechanismen, die bei der Übermittlung der Signale von Membranrezeptoren zur spezifischen mRNA involviert sind.

Die chromaffinen Zellen sind ein geeignetes Modell zur Untersuchung der molekularen Transduktionsmechanismen, welche die Genexpression von Neuropeptiden steuern:

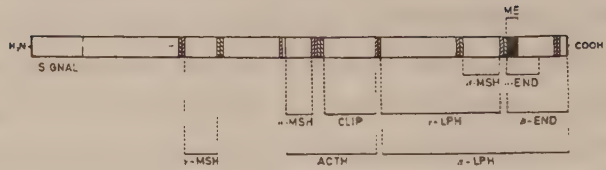
1. Die chromaffinen Zellen des Rindes synthetisieren große Mengen an Opioidpeptiden, das am besten charakterisierte Neuropeptidsystem.
2. Die chromaffinen Zellen sind leicht in großen Mengen zu isolieren und In-Vitro zu kultivieren: sie sind daher für biochemische Zwecke sehr gut geeignet. Weiterhin sind die chromaffinen Zellen von neuronalem Typ und dienen viel als Modell für neuronale Funktionen. Viele Einsichten in die Mechanismen der Freisetzung von Neurotransmittern wurde an chromaffinen Zellen erarbeitet.

Die Opioidpeptidsysteme

Seit der Entdeckung der ersten Opioidpeptide, den Pentapeptiden Met- und Leu-Enkephalin (Hughes et al., 1975), sind inzwischen über 20 Opioidpeptide isoliert worden. Rekombinante DNA Techniken haben gezeigt, daß diese aus 3 verschiedenen Opioidpeptidvorläufer hervorgehen (Nakankishi et al., 1979; Comb et al., 1982; Gubler et al., 1982); Noda et al., 1982; Kakidani et al., 1982), und daß die Diversität der Peptide der Spaltung dieser Präkursoren zuzuordnen ist (Abb. 1). Diese Vorläufer sind evolutionär verwandt und entstammen wahrscheinlich einem gemeinsamen ancestralen Gen. Sie sind ein gutes Beispiel für eine Genfamilie, die durch eine Reihe von internen Duplikationen entstanden ist.

Aus Proopiomelanocortin (POMC) (Noda et al., 1982) entsteht β -Endorphin, β -LPH, ACTH und MSH. Der Proenkephalin (Proenkephalin A) Vorläufer (Comb et al., 1982; Gubler et al., 1982; Noda et al., 1982) enthält sechs Met- und ein Leu-Enkephalin, und eine Reihe von höher molekularen Opioiden. Prodynorphin (Kakidani et al., 1982) (Proenkephaline B) enthält drei Leu-Enkephalin, und durch unterschiedliches Prozessieren entstehen u.a. α - β -Neo-Endorphin, Dynorphin-(1-8), A- und B-, und Leumorphin (Höllt, 1983). Alle diese Vorläufer können gewebespezifisch gespalten werden (Douglass et al., 1984; Udenfriend et al., 1983; Seizinger et al., 1984), z.B. wird das Proenkephalin in einigen Hirnarealen zum größten Teil zu Enkephalin gespalten, während der Vorläufer in der Nebenniere so gespalten wird, daß höher molekulare Opioidpeptide entstehen (Udenfriend and Kilpatrick, 1983; Seizinger et al., 1984; Liston et al., 1983), welche alle Enkephalinsequenzen am N-Terminus haben. Die neuroaktiven Peptide dieser Opioidpeptidvorläufer regulieren verschiedene

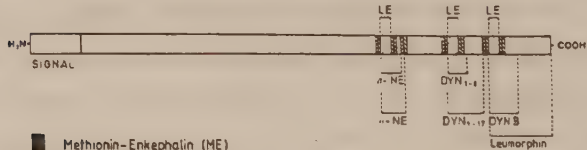
PRA-PRO-OPIOMELANOCORTIN (265 Aminosäuren)



PRÄ-PROENKEPHALIN A (263 Aminosäuren)



PRÄ-PROENKEPHALIN B = PRÄ-PRODYNORPHIN (256 Aminosäuren)



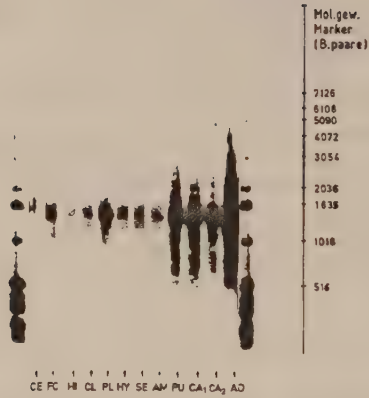
- Methionin-Enkephalin (ME)
 - Leucin-Enkephalin (LE)
 - Lysin
 - Argin
- } Prozessierungsstelle

Abb. 1: Struktur der drei Opioidpeptidpräkusoren. Abkürzungen, MSH: Melanocyten-stimulierendes Hormon, END, Endorphin, LPH: lipotropes Hormon, NE: neo-Endorphin, DYN: Dynorphin, HP: Heptapeptid (Met Enk₈Arg⁰-Phe¹), OP: Oktapeptid (Met Enk-Arg⁰-Phe⁷-Leu⁸). CLIP: "Corticotropin-like intermediate lobe peptide". ACTH: Adrenocorticotropes Hormon.

physiologische Funktionen, durch ihre Interaktion mit dem Nervensystem, endokrinen Systemen und dem Immunsystem (z.B. Stress und Analgesie, circadiane Rhythmen, Lernvermögen, Nahrungsaufnahme usw.) (Miller, 1984; Mathews et al., 1983; DeWied et al., 1982; Chang, 1984; Millan and Herz, 1985).

Die Verwendung von klonierten DNAs, die zu den für die Opioidpeptide kodierenden mRNAs komplementär sind, ermöglichen Untersuchungen der Regulation der Genexpression dieser Peptide. Alle drei Opioidpeptidvorläufer werden im Gehirn und unterschiedlichen peripheren Organe exprimiert. In einer vorangehenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Proenkephalin-System in hohen Mengen im Gehirn, aber zu noch weitaus höheren Mengen in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks des Rindes exprimiert wird (Abb. 2). Dies stellte sich als besonders vorteilhaft heraus, da die chromaffinen Zellen des Rinder-Nebennierenmarks ein gutes In-vitro Modell für Studien neuronaler Mechanismen der Genexpression darstellen.

a)



b)

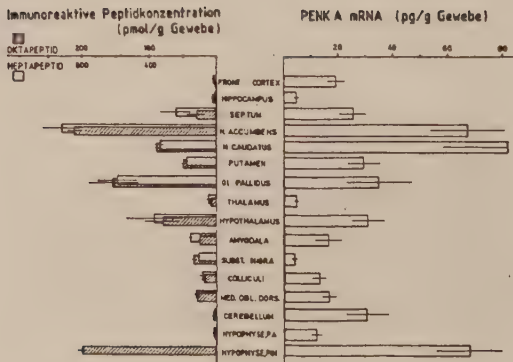


Abb. 2:

- a) RNA-Northern Blot von Proenkephalin mRNA aus Gehirn und Nebennierenmark des Rindes. Poly (A)⁺-mRNA aus 1.5 - 1.8g Gewebe wurde auf einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit einer ³²P-markierten einzelsträngigen cDNA-Sonde, die zu 504 Basen der PENK-mRNA des Rindes komplementär war, hybridisiert. Abkürzungen: CE: Cerebellum (50 µg Poly(A)⁺-mRNA), FC: Frontaler Cortex (11 µg), CL: Colliculi (6.3 µg), HI: Hippocampus (3.1 µg), Pl: Pallidum (4.1 µg), HY: Hypothalamus (6.7 µg), SE: Septum (10 µg), AM: Amygdala (4.1 µg), PU: Putamen (5.6 µg), CA₁ und CA₂: zwei unabhängige Extraktionen vom Nucleus caudatus (CA₁: 3.5 µg, CA₂: 2.5 µg), AD: Nebennierenmark (1.4 µg, aus 0.15 g Gewebe). Molekulargewichtsmarker auf beiden Seiten sind ³²P-endmarkierte DNA-Fragmente. Der Blot zeigt eine für vier unabhängige Extraktionen repräsentative Verteilung.
- b) Vergleich der immunoreaktiven (ir-) Konzentrationen an Met-Enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ (Heptapeptid) und Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (Oktapeptid) mit denen von Proenkephalin-A-mRNA in Rindergehirn und Hypophyse. Die Peptidwerte stellen Mittelwerte + Standardfehler von vier Bestimmungen dar. Die mittels Hybridisierung in Lösung gemessenen mRNA-Spiegel sind Mittelwerte + SD von 2-4 Gewebeextraktionen. PA: Pars anterior, PIN: Pars intermedia-nervosa der Hypophyse.

Die chromaffine Zelle

Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks leiten sich entwicklungsgeschichtlich vom Sympathicus ab und sind von cholinergen aber präganglionären Fasern innerviert (Carmichael and Winkler 1986). Aus den chromaffinen Zellen wurde das erste, in Reinform isolierte Hormon Adrenalin isoliert. Das ihm sehr ähnliche Noradrenalin wird außerdem in sympathischen Neuronen synthetisiert. Die Produktion und Sekretion des Adrenalins und einer Reihe von Neuropeptiden (Opioide, Vasointestinales Peptid (VIP) Tachykinine (z.B. Substanz P) etc.) in der chromaffinen Zelle wird nervös gesteuert durch Reize des Nervus Splanchnicus des Sympathicus. Die chromaffinen Zellen können also als Teil des sympathischen Nervensystems gesehen werden. Sie weisen auch viele Eigenschaften auf, die Neuronen eigen sind:

-in Zellkultur formen sich axonähnliche Fortsätze, was auf eine große Ähnlichkeit zu Neuronen schließen läßt (Unsicker et al., 1980; Trifaro and Lee, 1980; Naujoks et al., 1982; Unsicker et al., 1983; Unsicker and Hofman, 1983; Bader et al., 1981).

-PC12 Zellen, Tumorzellen, die aus chromaffinen Zellen hervorgehen, haben im differenzierten Zustand große Ähnlichkeit mit sympathischen Neuronen (Schubert et al., 1978).

-In-vivo-Transplantationsexperimente deuten darauf hin, daß chromaffine Zellen, in das zentrale Nervensystem (Gehirn, Rückenmark) transplantiert, neuronale Funktionen steuern können (Freed et al., 1981; Sagen et al., 1986).

Untersuchungen

Es sollten Mechanismen der Regulation der Proenkephalin-Genexpression untersucht werden. Zunächst wurden Methoden der RNA-Extraktion sowie die Synthese einzelsträngiger Nukleotidsonden, und einer Meßmethode zur Hybridisierung in Lösung, erarbeitet. Nach Erstellung eines In-vitro Zellkultursystems aus chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, wurden an diesem Modell mittels spezifischer pharmakologischer und biochemischer Manipulationen die Rolle der elektrischen Aktivität, des Adenylatzyklase- und Phospholipase-C-Systems in der Regulation der Proenkephalin mRNA-Expression untersucht.

II. MATERIAL AND METHODEN

II.1. Primärkulturen von Chromaffinen Zellen des Rindes:

Anlage der Zellkulturen

Die Herstellung von Zellkulturen aus Rindernebennierenmark erfolgte modifiziert nach Livett (1984).

Rindernebennieren aus dem Schlachthof München wurden retrograd mit phosphat-gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (PBS), die 10mM Hepes pH 7.4, sowie Penizillin (100 Einheiten/ml), Heparin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (20 µg/ml) enthielt, injiziert und auf Eis gehalten (ca. 30 min.). Im Labor wurden sie weiter retrograd mit dieser Lösung perfundiert (20-30min, 0.5ml/min), um einen Großteil der Erythrozyten auszuwaschen, anschließend mit 0.05% Collagenase in demselben Puffer, ohne Heparin. Auf diese Weise wurde das Nebennierenmark leicht anverdaut, so daß man es leicht vom Kortex entfernen konnte. Dies ist wichtig, zumal der größte Teil der Zellen, die die Proenkephalin mRNA exprimieren, an den Kortikalgrenzen (siehe Abb. 3, In SITU HYBRIDISIERUNG). Das Nebennierenmark (MEDULLA) wurde kleingeschnitten, zweimal mit PBS gewaschen und 60-90min. in Dispersionsmedium bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert (DNaseI 125µg/ml, BSA 10µg/ul, 0.05% Collagenase, in heparin-freiem PBS). Der Überstand wurde zentrifugiert, die Zellen in PBS resuspendiert und zunächst durch ein Nylonnetz mit 60-80 µm großen Poren, dann durch eines mit 40 µm Poren, filtriert. Nach der Zentrifugieren wurden die Zellen in PBS mit 1% BSA (pH7.4) resuspendiert, über eine 5% BSA Lösung geschichtet und zentrifugiert (300 upm, 5min.,). Dieser Vorgang wurde wiederholt. Durch die



A



B



C

Abb. 3: A) Histologische Färbung (Kresylviolett) eines Schnittes einer Rindernebenniere.
 B) Immunohistochemischer Nachweis von Enkephalin-haltigen Peptiden durch den monoklonalen Antikörper 3-E7 (Peroxidase / H_2O_2 -Färbung).
 C) Autoradiogramm eines angrenzenden Schnittes nach Hybridisierung mit einzelsträngiger cDNA-Sonde für Proenkephalin mRNA.

Schritt werden die chromaffinen Zellen weiter gereinigt.

Das Pellet wurde in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), 10% fötalem Kälberserum, Glutamin (200 µg/ml), Fluorodeoxyuridin (10 µM) und Antibiotika (siehe oben) resuspendiert und einem Haemozytometer gezählt und nach Überprüfung ihrer Unversehrtheit mit Trypanblau (90%-95% Unversehrtheit) auf collagen-beschichteten "Costar-24-Well" Platten in einer Dichte von $4-5 \times 10^5$ Zellen pro Schale ausplattiert. Nach einer Anwuchsphase von ca. 48hr bei 37°C 5% CO₂/95%O₂ wurde das Medium durch DMEM mit Glutamin (0.2 mg/ml), Kanamycin (50 µg/ul), Fluorodeoxyuridin (10 µg/ml) und N₂-Zusatz (Bottenstein und Sato, 1979) ersetzt und je nach Angabe zum Versuch verwendet.

NB: In den ersten zwei Versuchen (Abschnitte III.2, III.3) war Kulturmedium noch das Antibiotika Amphotericin present und das N₂-Zusatz wurde nicht verwendet. Die darauffolgenden Experimente hingegen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

II.2. Extraktion von Ribonukleinsäuren

II.2.1. Extraktion aus chromaffinen Zellen: die Zellen wurden in der Kulturschale mit 10 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.5% SDS mit 100 µg/ml Proteinase K bei 37°C, 45-60min lysiert, anschließend mit 1 Vol. Phenol/Chloroform: iso-Amylalkohol (1/1) extrahiert, mit 2.2 Vol. Äthanol und 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH5.2) übernacht bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation sedimentiert (12000 upm, 4°C, 20min). Das Sediment wurde einmal mit 70% Äthanol gewaschen, in einem Lyophilisator getrocknet, und in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen. Die Gesamtnukleinsäuren (GNS: DNA, RNA) wurden durch Spektrophotometrie bestimmt oder durch Quantifizierung auf einem 2% Agarose-gel das Ethidium-Bromid (0.5 µg/ml) enthielt. Dazu wurde die Probe auf das Gel aufgetragen und 1-2 Stunden einziehen gelassen. Anschließend wurde bei UV-Licht ein Polaroid Photo gemacht und das Negativ einer optischen Densitometrie unterzogen (LKB, Laser Densitometer). Durch Vergleich mit einer Standardkurve aus ultraschallbehandelter Lachs DNA konnte die Menge an gesamten Nukleinsäuren annähernd bestimmt werden. Um die exakte Menge an RNA zu bestimmen wurde der Nukleinsäureextrakt auf einem 1% Agarosegel (elektrophoretisch (in 10mM Na-Phosphatpuffer) elektrophoretisch aufgetrennt und die Menge an ribosomaler RNA (S28/S18) bestimmt. Eine Ausbeute von 1-2 µg GNS/5x10⁵ Zellen wurde erhalten und die Abweichungen zwischen den jeweiligen Kulturschalen betrug 10-15%.

II.2.2. Extraktion aus Gewebe

II.2.2.1. Extraktion der Gesamt-RNA

Phenolextraktion: Die Gewebeextraktion erfolgte modifiziert nach Rosen und Monahan (1982) in 10 Vol. 0.5% SDS, 75mM Tris-HCl, 25 mM EDTA (pH8)/Phenol (1: 1). Nach Zugabe von 1 Vol. CHCl_3 -Iso-Amylalkohol (24:1) wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt, um eine klare Oberphase zu erhalten. Anschließend wurde mit 1 Vol. CHCl_3 -Iso-Amylalkohol ausgeschüttelt, die wässrige Phase mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH5.0) und 2.2 Vol. Äthanol versetzt, und die Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugation der Nukleinsäuren und Waschen mit 70%igem Äthanol wurde das Pellet in 2-3 ml 3 M Na-Acetat (pH5.0) mehrfach suspendiert und abzentrifugiert, um bevorzugt DNA aufzusammeln. Nach erneuter Äthanolpräzipitation ergaben sich je nach Gewebeart 0.4-3 mg RNA pro g Gewebe.

Guanidinium/Caesiumchlorid Methode: Als RNA-Extraktion für Nierenmarkgewebe wurde die CsCl-Methode verwendet Chirgwin et al. (1979). Für die RNA-Extraktion mittels Guanidinium/Cäsiumchlorid wurde das gefrorene Gewebe in 5-8 Vol. 6M Guanidin-Isothiocyanat, 50 mM Na-Citrat pH 7, 0.5% Sarcosyl und 5% β -Mercaptoäthanol homogenisiert. In einem SW-28-Rotor (Beckman, ca. 38 ml/Ausschwingbeche) wurde das Homogenat über eine Schicht aus 9 ml 5.7 M CsCl/75mM Na-Acetat (pH5) geschichtet und 36 Std. bei 20°C und 120000g (25000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde im SDS/Tris/ EDTA-Puffer (s.o.) aufgenommen, kurz bei 65°C gelöst und einmal mit Phenol extrahiert (wie oben). Nach Äthanolfällung war die Ausbeute an Gesamt-RNA 0.5 mg/g Gewebe.

II.2.2.2. Isolierung von mRNA

Messenger RNAs (mRNA) machen nur wenige Prozente (1-4%) der Gesamt-RNA-Fraktion aus, deren Hauptbestandteil neben Transfer RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA) (ca. 80%) darstellt. Oft ist auch der Anteil der zu messenden, spezifischen mRNA so gering, daß eine Anreicherung der gesamten mRNA Population erforderlich ist. Zur Isolierung von reiner mRNA macht man es sich zunutze, daß sehr viele eukaryontische mRNAs polyadenyliert sind, d.h. sie tragen an ihrem 3'-Ende eine Sequenz von oft mehr als 100 Adeninnukleotiden. Chromatographie auf Oligo-(dT)-Zellulose Säulen nach Aviv und Leder (1972) erlaubt es, polyadenylierte mRNA (Poly A⁺-mRNA), zurückzuhalten und durch geeignete Puffer selektiv zu eluieren.

Zur Isolierung von mRNA wurde die Gesamt-RNA in H₂O gelöst, nach Zugabe von EDTA zur Endkonzentration 1mM (zur Verhinderung von mRNA-Strangbrüchen) 10Min. bei 60°C erhitzt, auf Eis gekühlt und auf Oligo (dT)-Säulen in Bindungspuffer gegeben (0.5M KCl, 10mM Tris pH 7.5). Das Eluat wurde zweimal reappliziert und anschließend nicht polyadenylierte-RNA (=rRNA und tRNA) mit Bindungspuffer ausgewaschen, bis die optische Dichte des Eluats < 0.002 O.D. war (ca. 4 Säulenvolumina). Poly(A)⁺-mRNA wurde anschließend mit einem Puffer geringer Ionenstärke eluiert (10mM Tris-HCl, pH7.5). Die Ausbeute an Poly(A)⁺-mRNA betrug 0.5-3% der Gesamt-RNA.

II.3. Nukleinsäure Hybridisierung

Zur Charakterisierung einer spezifischen mRNA aus einem Gemisch von Nukleinsäuren werden verschiedenartigste Methoden verwendet, die jedoch alle gemeinsam haben, daß (radioaktiv-markierte oder biotinylierte) cDNA oder cRNA Sonden eingesetzt werden. Diese Sonden hybridisieren mit solchen Sequenzen, zu denen sie komplementär sind. Durch Bestimmung der radioaktiven Hybride kann dann die Menge spezifischer mRNA errechnet werden. Dies kann durch verschiedene Methoden erreicht werden.

II.3.1. "Northern-Blot"-Analyse: Mit dieser Methode läßt Menge und molekulare Größe der hybridisierenden RNA-Spezies bestimmen. Das Gemisch an Nukleinsäuren wird glyoxyliert nach McMaster and Carmichael (1977) (2vol. RNA in H_2O , 3vol. DMSO, 1vol. Glyoxal M. (254 μ l glyoxal 40% + 18 μ l 1M Na-Phosphat, 60min, 50°C) und auf einem 1.2% Agarose-gel geringer Ionenstärke (10mM Na-Phosphat pH 7.0) nach Ladung und Größe aufgetrennt. Bleibt der pH unter 8.0, bleibt unter diesen Bedingungen die mRNA während des Laufes denaturiert und zeigt ein Migrationsverhalten, daß mit DNA Standard vergleichbar ist. Das aufgefächerte RNA Spektrum wird anschließend mit 20xSSC (1xSSC= 0.15M NaCl, 0.015 M Na-Citrat, pH 7.0) auf eine Nitrozellulose transferiert, bei 80°C 2 Stunden gebacken und mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert. Durch Autoradiographie kann der radioaktive Hybrid relativ genau quantifiziert werden. Durchführung: Bevor der Blot mit der Sonde hybridisiert werden kann, muß zunächst nach Wahl et al. (1979) eine Prähybridisierung durchgeführt werden mehr als 4 Std. Die Prähybridisierungslösung beste

aus: 50% Formamid, 5xSSC, 50 mM Na-Phosphat pH 7.0, 5x Denhardt (je, 0.1% Polyvinyl-Pyrrolidon 360, Ficoll 400, BSA, 0.25 mg/ml ultraschall-behandelte Lachs-DNA). Die Hybridisierung wird in derselben Lösung (42°C, 24 Std.), mit 5% Dextransulfat angereichert, mit ca. 10000 cpm einzelsträngiger cDNA/cm² Fläche durchgeführt. Anschließend wird der Filter gewaschen: 4x5 Min. in 2xSSC, 0.1% SDS bei Raumtemperatur, 2x20 Min. in 0.1xSSC, 0.1% SDS bei 50°C. Anschließend folgt eine Autoradiographie mit einem Röntgenfilm (Kodak XAR-5) bei -70°C in einer Kassette mit Reflektionsfolie.

II.3.2. Hybridisierung in Lösung

Prinzip: Die "Northern-Blot"-Methode hat, wie erwähnt, den Vorteil daß Größe und Konzentration spezifischer mRNAs gemessen werden kann. Sie verlangt jedoch viele experimentelle Schritte wodurch Schwankungen in der Messung auftreten können und nur wenige Extrakte können gleichzeitig verarbeitet werden. Eine Hybridisierung in Lösung bringt den großen Vorteil, daß eine höhere Sensitivität in der Messung erreicht wird, geringe Mengen an spezifischer mRNA sehr genau und reproduzierbar bestimmt werden können, und hunderte von Proben gleichzeitig gemessen werden können.

Das Prinzip der Hybridisierung in Lösung wurde schon vor Jahren zur Bestimmung der DNA und RNA Sequenzkomplexität in Geweben angewandt (Hastie and Bishop, 1976). Es konnte dabei die Anzahl verschiedener DNA und RNA Sequenzen und die Anzahl der Kopien jeder Sequenz pro Zelle bestimmt werden. Ebenfalls wurde es dazu verwendet die Konzentration spezifischer mRNA in einem RNA oder DNA/RNA Extrakt zu bestimmen. Um spezifische RNA Konzentrationen zu messen

wurde das Ausmaß ("rate of") der Hybridisierung einer RNA Probe mit einer radioaktiv-markierten einzelsträngigen cDNA bestimmt. Bei einem großem Überschuß an spezifischer mRNA verläuft die Hybridisierung der cDNA-Sonden nach einer Kinetik pseudo- erster Ordnung. Das Ausmaß der Hybridisierung (%H) ist eine Funktion der Zeit t und der Konzentration an hybridisierbarer mRNA (Ro):

$$\%H = 1 - e^{-k \cdot Rot}$$

Also je höher die spezifische mRNA-Konzentration ist, desto schneller ist die Hybridisierung. Da das Ausmaß der Hybridisierung von der mRNA Konzentration und der Hybridisierungszeit abhängt, kann %H gegen Rot graphisch aufgezeichnet werden. In dem die Rot-Werte verschiedener RNA-Extrakte verglichen werden, bei denen das Ausmaß der Hybridisierung %H = 50% beträgt ($Rot_{1/2}$), bekommt man ein relatives Maß der unterschiedlichen mRNA Konzentration in jedem Extrakt. Vergleicht man es mit dem $Rot_{1/2}$ -Wert einer gereinigten spezifischen mRNA kann der Anteil der spezifischen mRNA im Gesamtextrakt bestimmt werden. Diese Meßmethode ist jedoch relativ zeitaufwendig und oft ist eine gereinigte mRNA nicht erhaltbar. Es ist wesentlich praktischer, wählt man eine fixe Zeit der Hybridisierung und vergleicht direkt das Ausmaß der Hybridisierung, %H, in den jeweiligen Extrakten. Voraussetzung dafür ist, daß die eingesetzte mRNA und Zeit der Hybridisierung so gewählt werden, daß sie in einem Bereich liegt in dem es sich linear zur Menge der hybridisierenden spezifischen mRNA verhält. Dies kann relativ einfach bestimmt werden indem man mit einer einzelsträngigen cDNA Sonde eine einzelsträngige mRNA oder mRNA hybridisiert und eine Standardkurve

konstruiert (siehe unten). Die eingesetzte Menge an RNA-Extrakt wird nun so gewählt, daß ^3H sich möglichst auf dem linearen Teil der Standardkurve befindet. Die Sensitivität, d.h. die untere Grenze der Meßbarkeit kann noch durch längere Hybridisierungszeiten vergrößert werden. Abb.4 zeigt das Prinzip und Vorgehen dieser Methode. Eine radioaktiv- markierte (^{32}P -) einzelsträngige DNA wird zu einer RNA-Preparation gegeben, und für 18-24 hybridisiert. Anschließende Behandlung mit S1-Nuklease (einem Enzym, das einzelsträngige aber nicht doppelsträngige DNA oder RNA-DNA Hybride abbaut) führt zu einem radioaktiven Hybrid, dessen Menge proportional zur vorliegenden mRNA ist. Abgebaute Nukleotide werden nach Präzipitierung des Hybrids mit TCA auf Eis, durch Glasfaserfilter (Whatman GF/C) hindurchgewaschen. Der Hybrid bleibt zurück und kann in einem β -Szintillations-Zähler gemessen werden.

Vorversuche zur Optimierung der Reaktion

Bei einer Hybridisierung von ca. 30% der eingesetzten cDNA-Sonde ist einerseits genügend hybridisiert, um gut messen zu können, andererseits ist die Kurve auch noch steil genug, um kleine Unterschiede von R_0 genau messen zu können. Bei den hier eingesetzten Mengen hybridisierbarer mRNA betrug die Zeit bis zu 30%-Hybridisierung ca. 24h.

Der Einfluß der Temperatur auf die Hybridisierungsreaktion ist in Abb. 5A gezeigt. Eine möglichst hohe Temperatur mit möglichst hoher Stringenz (und dadurch spezifischer Bindung) ist wünschens-

mRNA-Gemisch

radioaktive einzel-
strängige cDNA

spezifischer mRNA /
cDNA-Hybrid

mRNA/cDNA Hybrid
+ Nukleotide

filtergebundener
mRNA/cDNA-Hybrid

durchgewaschene
Nukleotide

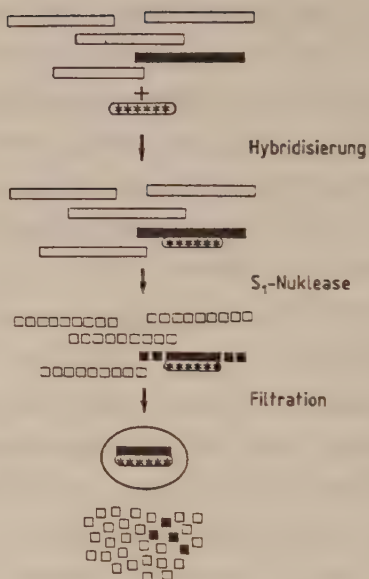


Abb. 4: Schema der Hybrisisierung in Lösung.

wert. Da bei höheren Temperaturen aber auch die spezifische Hybridisierung zurückgeht, wurde empirisch eine optimale Temperatur von ca. 45-50°C ermittelt.

Als Standardkurve für die Quantifizierung der hybridisierten cDNA wurde der Phage M13 mit mDNA-Insertion verwendet, der die Sequenz homolog zur mRNA enthielt und auch zur Herstellung der radioaktiven Sonde verwendet worden war. DNA: DNA-Hybridisierungen sind jedoch im Gegensatz zu RNA: DNA-Hybridisierungen stark von der Formamidkonzentration abhängig. Abbildung 5b zeigt, daß das Hybridisierungssignal DNA: DNA mit steigender Formamidkonzentration immer kleiner wird, während RNA: DNA (gemessen durch die Hybridisierung von cDNA-Sonde an mRNA aus Rindernebenmark) von 0-40% konstant bleibt. Für die Standardkurve mit M13 mDNA wird daher kein Formamid verwendet, während in den RNA-Proben 40% Formamid enthalten sind bei dieser Konzentration an Formamid ist die DNA: DNA-Hybridisierung viel weniger effektiv als die von RNA: DNA). Eventuelle unspezifische Hybridisierungen mit DNA in der zu untersuchenden Probe werden also möglichst klein gehalten.

Bei der Behandlung des Hybrids mit S1-Nuklease war eine Konzentration zu wählen, die möglichst effektiv alle Einzelstränge abbaut, aber noch keine Doppelstränge angreift (Gefahr bei zu großen Konzentrationen). Abbildung 5c zeigt einzelsträngige radioaktiv markierte cDNA im Vergleich mit doppelsträngiger (dazu wurde ein verwendet) bei verschiedenen S1-Konzentrationen. In einem Bereich von 4-30 Einheiten S1-Nuklease pro Reaktionsansatz werden alle Einzelstränge, aber noch keine Doppelstränge verdaut. Daher wurde für die folgenden Untersuchungen eine Konzentration von 6-8 Einheiten S1-Nuklease/ Ansatz gewählt.

Abb. 5

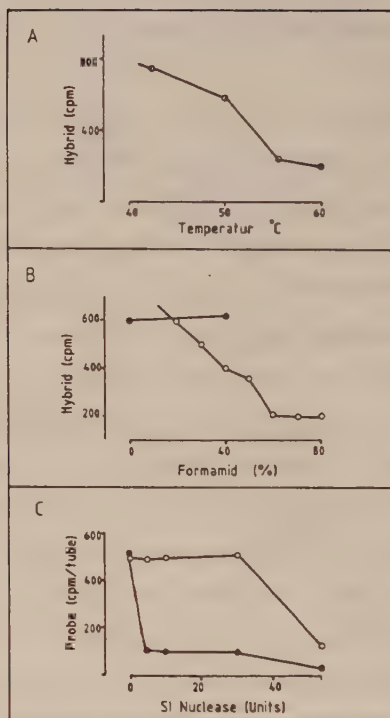


Abb. 6

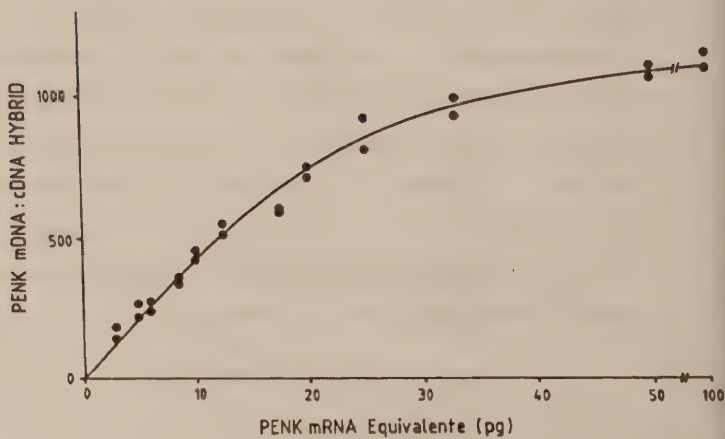


Abb. 5,6: Vorversuche zur Hybridisierung in Lösung

Verwendet wurde eine cDNA-Sonde mit einer 504 Basenpaaren großen Insertion, die für Proenkephalin A aus Rindernebnierenmark kodierte, und mRNA aus Rindernebnierenmark (A,B) sowie ein einzelsträngiger M13 mit einer PENK-A-mDNA-Insertion (B,C,D).

A: Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung von 0.1 µg mRNA aus Rindernebnierenmark mit einzelsträngiger cDNA-Sonde für PENK A.

B: Abhängigkeit der Hybridisierung von der Formamidkonzentration: 0.1µg mRNA: cDNA-Sonde (ausgefüllte Kreise), 140 pg M13 mRNA: cDNA-Sonde (offene Kreise).

C: S1-Nuklease-Abbau von Einzel- und Doppelsträngen (2h bei 47°C) in Abhängigkeit von der Nuklease Konzentration (ausgefüllte Kreise: einzelsträngige cDNA-Sonde, offene Kreise: doppelsträngiger Hybrid aus M13 mRNA und cDNA-Sonde).

Abb. 6: Standardkurve von M13 mRNA mit einzelsträngiger cDNA-Sonde. Ein pg mRNA-Äquivalent entspricht 5.5 pg M13-Phagen-mDNA. Der nuklease-resistente Hintergrund beträgt etwa 100 cpm/Gefäß.

Abbildung 6 zeigt eine typische Standardkurve mit M13 mRNA. Beispiel des 504 Basen großen PENK-A-Fragments, das in M13 subkloniert wurde. Der Phage M13 hat eine Größe von 7236 Basen. Mit PENK-Insertion ist er 7740 Basen groß. Da die zu messende PENK-mRNA 1400 Basen groß ist, entsprechen ca. 5.5 pg M13 in der Standardkurve 1 pg mRNA. In der gezeigten Standardkurve ergab sich eine Sensitivität von ca. 1 pg PENK-mRNA pro Reaktionsansatz.

Durchführung

Die Hybridisierung in Lösung wurde nach diesen Vorversuchen folgendermaßen durchgeführt: in 30 µl Reaktionsansatz 40% Formamid, 0.6 M NaCl, 20 mM Tris, 4 mM EDTA (nach Durnam und Palmiter, 1980) mit ca. 3000 cpm cDNA unter sterilen Paraffin bei 45-50°C für 24 h, anschließend pro Ansatz 6 Einheiten S1-Nuklease in 500 µl 0.3 M NaCl, 30 mM Na-Acetat pH 4.6, 3 mM Zn-Acetat, 250 µg/ml Lachsperma-DNA (2 h bei 37°C) und Fällung mit 10% Trichloressigsäure (auf Eis, ca. 15 min).

II.3.3 In situ Hybridisierung

Die Herstellung von Gewebeschnitten und die anschließende Hybridisierung wurden modifiziert nach Cox et al. (1984) und Lawrence und Singer (1985) durchgeführt. Gewebe wurde auf Trockeneis gefroren und in einem Kryostaten in 12-µm-Schnitte zerlegt. Nach Antauen und wieder Festfrieren auf Polylysin-beschichtete Objektträgern wurden die Schnitte in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, mit 0.2 M HCl 10 Min. lang inkubiert, anschließend mit

µg/ml Proteinase K für 15 Min. (37°C), Essigsäureanhydrid für 3 Min. und 4% Paraformaldehyd für 5 Min. behandelt. Die Prähybridisierung erfolgte für ca. 2 h in der Prähybridisierungslösung mit 50% Formamid von Abschnitt II.3.1. Anschließend wurde die einzelsträngige Nukleotidsonde (M13 cDNA für PENK-mRNA-Hybridisierung in demselben Puffer, der aber zusätzlich 10 mg/ml E.coli tRNA und Dextransulfat enthielt, in einer Konzentration von 5000 cpm/µl (20 µl/Objektträger) hybridisiert. Der Inkubationsansatz wurde dazu mit einem silikonisierten Deckgläschen in Paraffin eingebettet und 36 h bei 50°C inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend je 30 Min. in 6 x SSC, 3 x SSC und 1 x SSC gewaschen und in einer Filmkassette mit Cronex MRF-32-Film (Dupont) belichtet.

II.4. Synthese von radioaktiven Sonden

Die für die Hybridisierungen nötigen cDNA und cRNA Sonden können auf verschiedene Weise synthetisiert werden. In dieser Arbeit wurde ein doppelsträngiges Plasmid (PBR322) mit einer cDNA komplementär zur PENK-mRNA Sequenz verwendet, das von Prof. S. Numa und Kollegen in Kyoto, Japan, kloniert worden und unserem Labor zur Verfügung gestellt worden ist. Dieses Plasmid (PENK 5) kodiert für 816 Basen aus dem translatierten und 3' - nicht-translatierten Bereich von PENK aus dem Nebennierenmark des Rindes (Abb. 7). Dieses cDNA: mRNA Fragment ist in die PstI Restriktionsstelle des Plasmids pBR322 (Sutcliffe, 1978) hineinkloniert worden.

Zur Synthese von einzelsträngigen cDNA Sonden wurde das PstI Fragment aus dem PENK 5 Klon herausgeschnitten und in einen anderen

Vektor, den Bakteriophagen M13 subkloniert (Messing and Vieira, 1982). Hierzu mußte der Ausgangsklon PENK 5 zuerst vermehrt werden.

II.4.1. Plasmidextraktion

Plasmidhaltige Bakterien (E. coli HB 101), von Prof. Numa zur Verfügung gestellt) werden in 1.5 l Kolben in Nährmedien vermehrt. Das Plasmid wird anschließend in Gegenwart von Chloramphenicol amplifiziert. Chloramphenicol bindet an die ribosomale 50 S-Untereinheit und verhindert so durch Blockierung der Translation, die Replikation des Hauptchromosoms und die weitere Vermehrung der Bakterien. Replikation des Plasmids findet dennoch statt, eine Eigenschaft der sogenannten relaxierten Plasmide. Sie brauchen zwar eine intakte DNA-Polymerase I (PolI), können aber ohne De-novo-Proteinsynthese vermehrt werden. Die Zellhülle wird anschließend mit Lysozym gerade so weit anverdaut, daß die kleinen Plasmide, aber nicht die große chromosomale Bakterien DNA, heraustreten können. Phenolextraktion, RNase und Proteinase K Behandlung dienen der weiteren Reinigung der Plasmid DNA. Auf einer Biogel-Säule wird anschließend das Plasmid von den kleinen RNA- und kontaminierenden DNA-Bruchstücken abgetrennt. In einer CsCl- Gleichgewichtszentrifugation findet sich die Plasmid-DNA anschließend bei einer ganz bestimmten Dichte, wo man sie als Bande im UV-Licht (365 nm) durch die Interkalierung mit Propidiumiodid sichtbar machen kann. Die Bande wird abgesaugt und die DNA mit Äthanol präzipitiert.

Durchführung:

(Modifiziert nach Maniatis et al., 1982)

Verwendete Puffer:

Luria-Bertani Medium A: Bacto-Trypton 1%

Bacto-Hefeextrakt 0.5%

NaCl 90 mM, pH 7.5

Tetracyclin 50 µg/ml

Medium B: 20% Glucose (sterilfiltriert), 20ml für 1l

20% Casaminoessigsäuren: (25ml für 1l)

50 mM NaH_2PO_4

22 mM KH_2PO_4

9 mM NaCl

19 mM NH_4Cl

1 mM MgSO_4

0.1 mM CaCl_2

Lysierende Mischung C: 0.1% Triton

50 mM Tris-HCl (pH8)

6.25 mM EDTA

Eine Bakterienkolonie (z.B. E. coli HB 101 mit gewünschtem Plasmid) wird in Medium A im Schüttler bei 37°C über Nacht inkubiert, ein Aliquot davon anschließend in 1.5 l Medium B vermehrt, bis die optische Dichte ca. 0.6 beträgt. Dann ist die Zelldichte optimal für die Amplifizierung des Plasmids durch Zugabe von Chloramphenicol (150 mg/l). "High-Copy-Number"-Plasmide erlauben es, die Zahl der Plasmide pro Zelle von wenigen auf mehrere 100 zu steigern.

Nach Abzentrifugation der Bakterien und Suspendierung in Sucrose/50 mM Tris-HCl (pH8) werden sie mit einer Endkonzentration von 0.1% Lysozym und anschließend 0.05% Triton insgesamt 45 Min. Eis gehalten. Nach Ultrazentrifugation bei 35000g für 30 Min.

befindet sich das Plasmid im Überstand. Es wird mit 30 µg RNAase/ml (DNAase-frei nach 1/2 stündigem kochen) für 45Min. bei 37°C und mit 40µg/ml Proteinase K (30Min., 37°C) behandelt; dann folgen eine Phenol-SDS-CHCl₃-Extraktion und Äthanol-fällung. Auf einer Biogel-A-150-Säule ("50-100mesh", 3x50cm) in 0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH8), 1 mM EDTA und 0.1% NaN₃ wird das Plasmid von chromosomaler DNA und anderen Komponenten abgetrennt.

Eine weitere Reinigung erfolgt durch Ultrazentrifugation: 2.2g CsCl/2.1ml Plasmidlösung + 150µl Propidiumjodid (0.2%) werden mit Mineralöl bedeckt und 24h bei 20°C und 140000g im SW-50-Ausschwingrotor zentrifugiert. Im UV-Licht kann man zwei Banden lokalisieren, wovon die untere die "supercoiled" Form ist, die obere die "relaxed" Form. Die Banden werden mit einer Kanüle abgesaugt und auf einem kombinierten Kationen- und Anionenaustauscher vom Propidiumjodid und durch Dialyse vom CsCl gereinigt. Nach Äthanol-fällung kann die Ausbeute des Plasmids photometrisch bestimmt werden. Sie hängt vom verwendeten Vektor ab. Mit pBR322 ergab sich ca. 150µg Plasmid/1 Bakteriensuspension.

II.4.2. Subklonierung von DNA-Fragmenten in M13 Phagen

Der filamentöse E. Coli-Bakteriophage M13 enthält ein einzelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom. Der Lebenszyklus des M13 Phagen ist in Abb. 8 schematisch dargestellt. Die Adsorption des Phagen samt seiner Proteinhülle, und der Infektionsprozeß wird durch F-Pili an der Oberfläche von Bakterienzellen eingeleitet. Nach der Absorption wird der einzelsträngige Phage zunächst durch Synthese eines komplementären (-) Strangs, in eine doppelsträngige

Infektion des Bakteriums
durch Phagen M13

Replikation über
doppelsträngige
replikative Form

Sekretion von
Tochterphagen

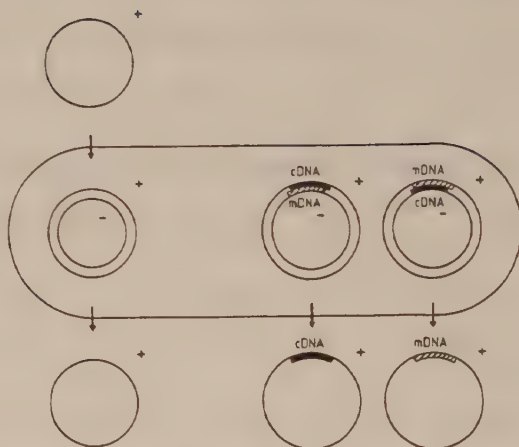


Abb. 8: Lebenszyklus des M13 Phagen. Der einzelsträngige Phage enthält einen (+) Strang, welcher nach Eindringen in das Bakterium einen komplementären (-) Strang synthetisiert (RF, replikative Form). In diese doppelsträngige RF-Form können mit Restriktionsenzymen DNA-Fragmente hineinkloniert werden. Je nach Orientierung der Insertion stellt der Phage dann (+) Tochterstränge vom ursprünglichen cDNA- oder mDNA-Strang her.
cDNA: Komplementäre cDNA
mDNA: zur cDNA komplementärer Strang

Replikative (RF-) Form übergeführt. Der (-) Strang dient als Muster für die anschließende Synthese von vielen (+) Tochtersträngen nach dem Modell der "Rolling circle"-Replikation. In einer späten Phase der Infektion wird der (+) Strang mit einer Proteinhülle umgeben und als Viruspartikel freigesetzt. Dabei wird die Wirtszelle nicht getötet, wie es bei anderen lytischen Infektionsabläufen anderer Phagen der Fall ist, sondern ihr Wachstum wird nur verlangsamt. Es entstehen dadurch Plaques auf dem Bakterienrasen, die klarer als ihre Umgebung erscheinen. Im doppelsträngigen Stadium der replikativen intermediären Form läßt sich der isolierte Phage mit Restriktionsenzymen schneiden, und gewünschte Fragmente, die aus anderen Klonen isoliert wurden, können hineinligiert werden ("Insertion"). Je nach der Orientierung in der doppelsträngigen Form werden dann nach Transfektion Tochterphagen mit dem einen oder dem anderen Strang des ursprünglich doppelsträngigen Fragments gebildet (Abb. 8).

Ligierung von Fragmenten

Zunächst wurde der Ausgangsklon PENK5 mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten und die Fragmente auf einem "Low Melting Point"-Agarosegel aufgetrennt (in 89 mM TrisBase pH 7,4, 89 mM Borsäure, 8 mM EDTA) und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das PENK cDNA Insertionsfragment enthält ein PstI Stelle. Es entstanden also 3 Fragmente: ein linearisierter PBR322, ein 504 Basen und ein 312 Basen Fragment. Die 504 und 312 Fragmente wurden aus dem Gel herausgeschnitten und nach Schmelzen der Agarose (10 min bei 60°C mit 5 vol. 20 mM Tris HCl pH7.6, 1mM EDTA), mit Phenol:Chloroform (1:1)

extrahiert, und mit 2.2 Vol. Äthanol präzipitiert. RF-Formen des M ("mp8), wurde ebenfalls im "Polycloning-site" mit PstI geschnitten. Um eine Selbstligierung des Vektors zu vermeiden wurde der geschnittene Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt. (Lyophilisierte DNA + 20 µl Tris 10mM pH8, 1 µl = 0.12 Einheiten Phosphatase, Std. bei 37°C, 3x Phenolextrahiert, 2x CHCl₃-waschen. Mit 2 Vol. Äthanol, 1/10 Vol. 3M NaAc pH5.2 bei -20°C fällen, zentrifugieren und trocknen). Dadurch werden endständige Phosphatreste entfernt und eine Ligation von zwei Enden, die beide mit Phosphatase behandelt sind, ist nicht mehr möglich. Das zu subklonierende Fragment wird jedoch nicht mit Phosphatase behandelt. Enthält nämlich ein Ende noch eine Phosphatgruppe, so reicht die Ligierung (Fragment und Vektor) des einen Stranges mit der Phosphatgruppe aus, die ganz doppelsträngige Struktur bis zur Replikation im Bakterium stabil halten.

Ligase Reaktion

Die vorstehenden Enden des 504 Basen Fragments und des geschnittenen, Phosphatase-behandelten Vektors werden in 10 µl 66 Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP und 2-3 Einheiten T₄DNA-Ligase aus E. Coli über Nacht bei 14°C ligiert. Dieser Ligationsansatz wird zu kompetenten E.Coli Zellen, die in der Lage sind den Phagen aufzunehmen, des Stammes JM101 gegeben, in der sich der rekombinante M13 Phage vermehren kann.

Herstellung von kompetenten Zellen

Eine Kolonie oder ein Aliquot eines Bakterien-Glyzerin Stocks (JM101) wird über Nacht in 2xTY Medium (16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro Liter) unter schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Von dieser Übernachtskultur werden 1 ml zu 20 ml frischen Medium gegeben und für weitere 3hr. bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig inkubiert man getrennt 20ml Medium mit etwas Tropfen Bakteriensuspension (wird bei der folgenden Ausplattierung als Bakterienrasen für den Phagen benutzt). Nach 3hr. Inkubation wird 2-5min. bei 7000g abzentrifugiert und das Sediment in 4 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 aufgenommen und 20 min auf Eis stehen gelassen. Durch CaCl_2 werden die Zellen kompetent gemacht. Kristalle durchlöchern die Zellmembrane so weit, daß der ligierte Vektor in die Zellen hineingelangen kann, diese aber noch nicht irreversibel geschädigt werden.

Transformation

Zu den kompetenten Zellen (300µl) wird der Ligationsansatz (5µl) hinzugegeben, 40min auf Eis stehen gelassen und 3min. auf 42°C erhitzt ("Hitzeschock"). Weiterhin werden bei diesem Schritt 3 Kontrollen mit angesetzt:

1. ungeschnittener Vektor "mp8"
2. geschnittener unligierter Vektor "mp8"
3. religierter Vektor "mp8" (Ligationskontrolle)

Ausplattierung und Selektion positiver Klone

Pro Gefäß, wird folgende Mischung vorbereitet:

40µl Isopropylthiogalactosid (IPTG) 100mM

40µl X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indioly-β-galactosid) 2% in Dimethylformamid

200µl frische E. Coli Zellen

270µl dieser Mischung werden zu jedem Transformationsansatz gegeben. 3ml H-Top Agar zugesetzt (auf 42°C vorgewärmt) und sofort auf trockene, vorgewärmte Petrischalen mit Agar gegossen. Nach Festigung bei Zimmertemperatur werden die Schalen invertiert über Nacht inkubiert. Das Selektionsverfahren beruht auf folgenden Eigenschaften:

Der verwendete M13 Phage enthält Teile des LacI-Gens, die gesamte regulatorische Region, jedoch nur die ersten 146 Aminosäuren des Lac Z-Gens. Das dadurch kodierte Protein ist daher kein funktionelles Enzym. Ebenfalls trägt das F-Episom des zu infizierenden E.Coli Bakteriums die DNA-Sequenz des Lac-Operons mit der sogenannten M15-Deletion im lacZ-Gen Bereich. Das durch den F-Plasmid kodierte β-Galactosidase Enzym ist auch inaktiv, da am N-terminalen Ende die Aminosäuren 11 bis 41 fehlen. Ein aktives Enzym kann jedoch durch Komplementierung entstehen, d.h. nach Transformation mit dem Phagen wird die Wirtsdefizienz durch das vom Phagen produzierte Proteinfragment von 146-N-terminalen Aminosäuren der β-Galactosidase aufgehoben. Aus den zwei inaktiven Enzymen entsteht durch Kombination in der Wirtszelle ein aktives Protein. Dies kann dann durch entsprechende Farbreaktionen nachgewiesen werden. Dabei setzt man dem Agar, auf dem die Bakterien zu züchten sind die farblose Substanz X-Gal zu, die durch β-Galactosidase zu dem tief-blauen 5-Bromo-4-chloro-Indigo hydrolysiert wird. IPTG dient zur Induktion.

tion der episomalen β -Galactosidase. Wird jedoch E. Coli mit einem rekombinanten M13-Phagen transformiert, der eine Insertion in der β -Galactosidase trägt wird kein aktives Enzym gebildet. x-Gal kann nicht hydrolysiert werden und die Kolonien (Plaques) bleiben farblos.

Isolierung des einzelsträngigen Phagen:

Eine farblose Plaque wird in 20ml 2xTY-Medium mit 0.1 O.D. E.Coli JM101 gegeben. Bei 37°C werden die Phagen ca. 6h vermehrt. Nach schonender Abzentrifugierung der Bakterien, wird der einzelsträngige Phage im Überstand mit 1/7 Vol. 20% Polyäthylenglykol (PEG) in 2.5 M NaCl gefällt. Nach sorgfältiger Entfernung von PEG-Resten wird das virale Pellet in 10 mM Tris-HCL (pH7.5)/1 mM EDTA gelöst, zur Entfernung der Proteinhülle mit Phenol extrahiert und mit Äthanol präzipitiert. Die Ausbeute beträgt ca. 50 µg M13 pro 20 ml Ansatz.

Zur Untersuchung welche Rekombinante vorliegt, kann entweder eine Restriktionsanalyse von der jeweiligen doppelsträngigen RF-Form gemacht werden. Anders können durch Hybridisierung und anschließender Gelektrophorese zwei komplementäre Phagen isoliert werden (mDNA: cDNA), die nach Markierung und Verwendung in einer "Northern-Blot" Analyse als mDNA oder cDNA erkannt werden können.

Restriktionsanalyse:

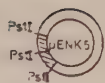
Die doppelsträngige RF-Form - oder, falls ein Plasmid untersucht werden soll, die Plasmid-DNA - wird mit geeigneten

Restriktionsenzymen gespalten, um zu entscheiden, welche Rekombinate vorliegt: Verwendet wird das Sediment der Phagenisolierung). Nach Auflösung in 8% Sucrose, 0.5% Triton, 10 mM Tris-HCl (pH8), 50 EDTA werden 25 µl frisch angesetztes Lysozym (10mg/ml) zugegeben. Nach 3 Sek. schütteln wird die Mischung 40 Sek. gekocht und das schleimige Pellet abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, mit Phenol extrahiert und die DNA mit Äthanol präzipitiert. Nach Einwirken von 20 µl RNase A (1 µg/ml) für 10 Min. bei 37°C wird die Restriktionsanalyse durchgeführt, und dann kann entschieden werden, welche Transformante vorliegen.

II.4.3. Synthese einzelsträngiger cDNA Sonden

Abb. 9 zeigt den Vorgang der PENK cDNA Synthese. Zunächst wird ein universeller Primer (17Basen), dessen 3'-Hydroxyl-Ende sich in unmittelbarer Nähe der Insertion befindet, an den einzelsträngigen M13 Phagen mit der mRNA Sequenz anhybridisiert (2hr, bei 65°C, 10mM Tris pH 8.0, 10mM MgCl₂). Anschließend wird bei Raumtemperatur mit Klenow Enzym (Fragment der DNA Polymerase, dem die 5'-3' Exonuklease-aktivität fehlt) verlängert. In Anwesenheit von α-³²P-dATP wird dabei eine einzelsträngige cDNA erzeugt (10µl Hybridisierungsansatz + 1µl dTTP, dGTP, dCTP (0.1 mM), + 1 µl 100mM Tris pH8, 100mM MgCl₂, + 1.5 Einheiten Klenow + 3-4 µl ³²P-dATP, Endvolumen 10 µl) die komplementär zur M13 mRNA ist und damit zur gewünschten mRNA. Die Länge der Sonde kann über die Menge an angebotenen radioaktiven Nukleotid variiert werden. Bei der Synthese von PENK cDNA wurden Moleküle mit einer Länge von ca. 450-500 Basen erzeugt.

pBR322 mit eingebautem
Proenkephalin-A-Fragment



Aufschneiden des Plasmids mit
PstI und Subklonierung in
einzelnsträngigem M13-Vektor

M13 mit einzel-
strängiger mRNA



Hybridisierung mit
synthetischem Primer

M13 mRNA mit an-
hybridisiertem Primer



Verlängerung des Primers
mit $\alpha^{32}\text{P}$ dNTPs und
Klenow-Enzym

M13 mRNA mit
 $\alpha^{32}\text{P}$ -markierter cDNA



Trennung der cDNA von
M13 mRNA unter de-
naturierenden Bedingungen



Abb. 9: Schema der cDNA Synthese

(Inkorporationseffizienz 80-90%). Der M13 wird anschließend von der radioaktiven cDNA auf einer denaturierenden Biogel A50 (100-200 Mesh, 0.7x20 cm, 30 μ l/min) getrennt. Hierzu wurde der Hybrid zunächst in 0.2N NaOH ca. 20min denaturiert und auf der Säule mit 0.1% SET (0.1% SDS, 0.5 mM EDTA, 1 mM Tris HCl pH7.5) eluiert. Nicht vollständig denaturierter oder renaturierter M13-mDNA /cDNA Hybrid eluiert zuerst als kleiner Peak, dann folgt der große cDNA Peak, und als letzte nicht eingebaute Nukleotide mit Phenol Rot Marker. Überprüfung auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel stellt sicher, daß nur Fraktionen mit ausschließlich einzelsträngiger cDNA für Hybridisierung in Lösung verwendet werden.

II. 5. Radioimmunoassay

II.5.1 "Solid-phase-RIA" mit monoklonalem Antikörper

Zellen wurden nach 10 Min. Kochen in 0.1 M HCl homogenisiert und bei 0°C in Anwesenheit von Enzymhemmern (Trypsininhibitor 0.05 g/l, Pepstatin A 0.3 g/l, Phenylmethylsulfonylfluorid 0.3 g/l) extrahiert. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 36000g wurden die Extrakte lyophilisiert und in RIA-Puffer aufgelöst. Kulturmedien wurden direkt lyophilisiert.

Der monoklonale Antikörper 3-E7 (Gramsch et al., 1983) erkennt alle, die Opioidsequenz Tyr-Gly-Gly-Phe... am N-Terminus enthaltenden Peptide ("Mixed Opioid Assay"). Microtiterplatten wurden mit dem 3-E7-Antikörper beschichtet (100 µl/Vertiefung, 1 mg/ml in 0.02 M Phosphat, 0.9% NaCl, pH 7.1 (PBS), Inkubation bei 37°C für 12 Std.). Dann wurden die Platten zweimal mit 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen, 4 Std. lang bei 37°C mit 3% BSA in PBS inkubiert (Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen) und mit PBS/0.1% Tween 20 und destilliertem H₂O gewaschen.

Im Assay wurden 50µl (10000cpm) ¹²⁵I-β-Endorphin und 100µl Standard oder Probe in PBS mit 1% BSA, 0.05% Tween 20 und 0.1% Poly-L-Lysin 4000 für 24h bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden anschließend dreimal mit PBS/0.1% Tween 20 und destilliertem H₂O gewaschen und in einem γ-Szintillations-Zähler gezählt.

II.5.2. "cAMP RIA"

Der cAMP RIA wurde freundlicherweise von Dr. T. Costa durchgeführt, wie zuvor beschrieben (Harper and Brooker, 1975).

II. 5.3. Immunohistochemie mit monoklonalem Antikörper

20- μ m-Schnitte wurden in 4% Paraformaldehyd 3 Std. lang fixiert, dann 1 Std. in PBS gewaschen. Anschließend wurde bei Raumtemperatur inkubiert:

60 Min. in 40% Methanol/0.3% H_2O_2 in PBS, 30 Min. in 1% Triton-X-100 in PBS, 30 Min. in 1% BSA, 16h mit 5 μ g/ml. Antiserum 3-E7 in PBS, 60 Min. mit einer 1:50-Verdünnung biotinyliertem Anti-Maus-Immunglobulin G, 30 Min. mit einer 1:100-Verdünnung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes.

Zuletzt wurde der gebundene Antikörper mit Diaminobenzidin und μ g/ml H_2O_2 sichtbar gemacht.

II.6. Bestimmung von Inositphosphaten

Die Inositol-Phospholipid-Hydrolyse in intakten Zellen wurde wie folgt bestimmt: Inkubation der Zellen über Nacht mit Myo-2- 3H -Inosit (spezifische Aktivität 17 Ci/mMole) dient der Markierung von Membranphospholipiden. Nach 4-maligem Waschen der Platten mit 1.0 ml frischem Medium werden die Zellen für 15 Min. in Medium mit 10 μ M $LiCl$ inkubiert (Berridge et al., 1982; Berridge, 1984). Dann wurde das Medium wieder gewechselt und nach Zugabe der zu untersuchenden Pharmaka weitere 30 min inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurde die Reaktion mit eiskaltem Methanol (1.0 ml) gestoppt. Die Zellsuspension wird mit 0.5 ml Chloroform versetzt und für 10 Sek. geschüttelt.

telt. Danach wird 0.5 ml Chloroform, 1.5 ml H_2O werden hinzugegeben und 15 Min bei 2000g zentrifugiert. Die obere Phase wird auf eine Dowex X8 Säule (1 ml) gegeben und mit 10ml H_2O , 15 ml 60 mM Natrium Formiat/5 mM Natrium-tetraborat gewaschen. Das Hydrolyseprodukt Inosit-1-Phosphat wird mit 15 ml 0.2 M Ammoniumformiat in 0.1 M Ameisensäure eluiert. Inosit-2-Phosphat und Inosit-3-Phosphat hingegen werden mit 15 ml 1 M Ammoniumformiat in 0.1 M Ameisensäure coeluiert. Die Radioaktivität in den ersten 4 ml jedes Eluats werden in einem β -Szintillationszähler gemessen.

II.7. Messung von Ca^{2+} -Aufnahme mittels $^{45}Ca^{2+}$

Zellen wurden 5 Min. mit $^{45}Ca^{2+}$ (4 $\mu Ci/ml$) bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Anschließend wird das Medium schnell abgesaugt und durch eiskalte physiologische Kochsalzlösung/1 ml (142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 5.6 mM Glukose, 0.1 mg/ml Ascorbinsäure, 5.6 mM Hepes pH 7.4) mit 1 mM $LaCl_3$, ersetzt. Nach dreimaligem Waschen werden die Zellen in 1 N NaOH lysiert, mit HCl neutralisiert und die Radioaktivität gemessen.

Materialien

Peptide wurden bei Peninsula, San Carlos, USA, gekauft, radioaktive Substanzen von Amersham, Braunschweig, Enzyme, Molekulargewichts-Marker, "Ultrapure"-Phenol, Natrium-Dodecylsulfat, Arcylamid Harnstoff, DMEM und fötaler Kälberserum wurden von Bethesda Research Laboratories (Eggenstein), "Suprapure"-Agarose und Oligo(dT)-Zellulose von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Nitrozellulosepapier stammte von Schleicher und Schuell (Dassel) und Guanidiniomethansulfat von Fluka (Neu-Ulm). Disphase I wurde bei Boehringer (Mannheim), Collagenase bei Interchem (Fürstenried), gekauft. Alle anderen Chemikalien und Pharmaka wurden bei Sigma (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) erworben.

III. Ergebnisse und Diskussion

III.1. Subklonierung von Proenkephalin Fragmenten in M13

Zwei für PENK (aus Rindernebennierenmark) kodierende PstI-Fragmente von 312 und 504 Basenpaaren aus dem pBR322-Plasmid PENK 5 (zur Verfügung gestellt von Prof. Numa, Japan) wurden in den einzelsträngigen Phagen M13 subkloniert - s. Abb. 10, in der die vier möglichen einzelsträngigen Rekombinanten angegeben sind.

Zur Synthese von 32 P-markierter cDNA-Sonde wird eine M13-Rekombinante benötigt, die eine Insertion des mRNA-Strangs enthält (das Klenow-Enzym benutzt diese M13 mRNA als Matrize zur Synthese der komplementären cDNA-Sonde). Nach Identifikation aller M13-Rekombinanten mit 504-Basen Insertion durch Restriktionsanalyse wurde ein Paar zweier Rekombinanten mit zueinander komplementären Insertionen durch Hybridisierung und anschließender Koelektrophorese von je zwei willkürlich gewählten M13 gefunden. Die Bahn, die ein solches Paar enthält, zeigt zusätzlich eine Bande bei größerem Molekulargewicht (Abb. 10). Nach Hybridisierung von Test-Blots konnte eine M13-Rekombinante mit mRNA-Insertion identifiziert werden, von dem sich einzelsträngige cDNA Sonden von ca. 400-500 Basen Längen herstellen ließen. Abb. 11 zeigt einen rekombinanten M13-Vektor, der nach Synthese des cDNA Stranges mit dem Restriktionsenzymen PstI und HindIII geschnitten worden ist. Durch schneiden mit PstI konnte ein ca. 500-Basenpaar-Fragment identifiziert werden; durch schneiden mit HindIII ein ca. 180-Basenpaar-Fragment und durch schneiden mit PstI und HindIII ca. 500-, 370- und 180-Basenpaar-Fragmente, identifiziert werden. Dieses Restriktionsmuster zeigt, urteilt man nach

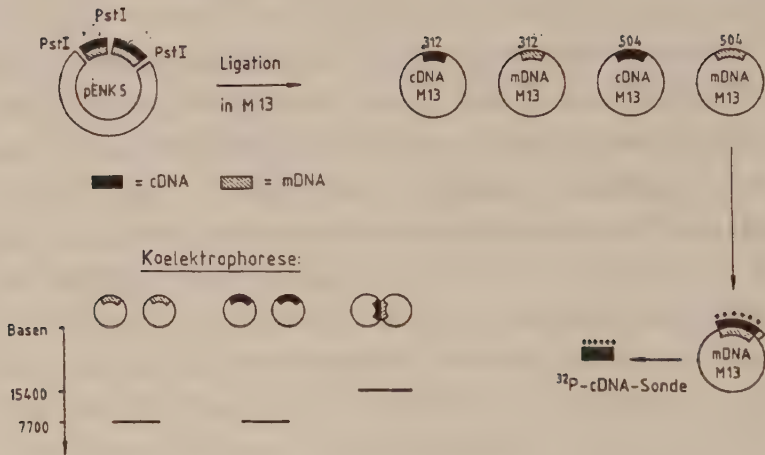


Abb.10: Darstellung der vier möglichen einzelsträngigen M13-Rekombinanten, die nach Subklonierung der zwei PstI-Fragmente aus dem Vektor pENK5 entstehen.

1 2 3 4 5

Molekulargewichts-
Marker (Basen-
paare)



1000

500

Abb. 11: Nach Synthese der radioaktiven CDNA an dem rekombinanten M13 Vektor (siehe Methoden) wurde der Hybrid mit PstI und Hind III geschnitten und die markierten Fragmente auf einem 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spalten: 1: DNA Standard, 2: M13 Hybrid, 3: PstI, HindIII, 4: HindIII, 5: PstI

Abb. 12

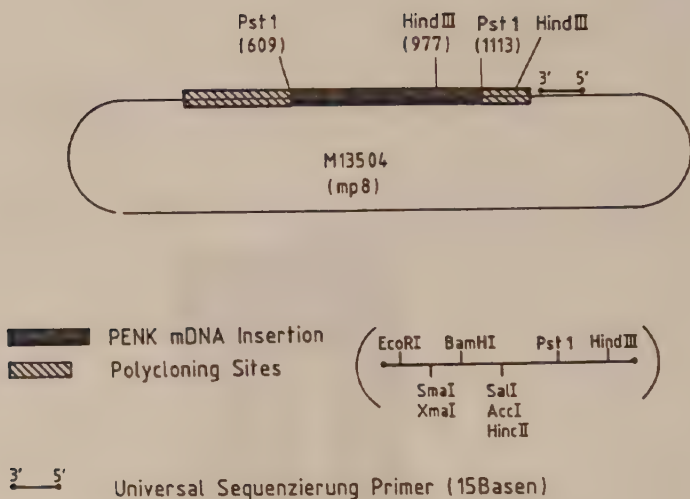


Abb. 13: Orientierung der PENK mRNA Insertion im rekombinanten M13-Vektor.

Abb. 12: Restriktionskarte des PENK5-Klons (aus Noda et al., 1982). Die Nummern repräsentieren Nukleotidreste in der mRNA Sequenz (5' - 3' Richtung), zu der die cDNA komplementär ist. Mit Nukleotidrest 1 fängt das AUG Initiationscodon an. Die Nukleotidreste in der 5' Richtung von Nukleotidrest 1 sind als negative Nummern gekennzeichnet.



der Restriktionskarte des PENK5 Klon (Abb. 12, Noda et al., 1982), daß das Insertionsfragment in dem M13 Vektor so orientiert ist, daß die Synthese der cDNA mit einer Sequenz beginnt, die zum 3'-Ende der PENK-mRNA komplementär ist (Abb. 13).

III.2. Elektrische Aktivität und Genexpression

Einleitung

Modulation der elektrischen Aktivität neuronaler Zellen bildet die Grundlage für Kommunikation im Nervensystem. Ein Aktionspotential, das im präsynaptischen Neuron, z.B. durch Interaktion mit einem Transmitter oder Hormon, entsteht, wird an der Nervenzelle weitergeleitet und führt an der nächsten Synapse zur Freisetzung von gespeicherten Transmittern. In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht ob Veränderungen der elektrischen Aktivität auch zu einer Modulation der Proenkephalin-mRNA Expression führen kann.

Ein Aktionspotential wird durch einen Einstrom von Na^+ -Ionen durch den potentialabhängigen Na^+ -Kanal eingeleitet. Durch den Einstrom von Na^+ entsteht eine Membran-Depolarisierung, d.h. das Membranpotential der Zelle sinkt, was zu einer Öffnung von K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen führt. K^+ -Ionen strömen aus der Zelle wodurch die Membrane repolarisiert wird, Ca^{2+} -Ionen aber in die Zelle wodurch die Repolarisationsphase verzögert wird. Eine Membrandepolarisierung kann durch externe Zugabe von KCl herbeigeführt werden. Die Zellmembran ist sehr permeabel für K^+ , viel mehr als für Na^+ , und eine Erhöhung der externen K^+ -Konzentration führt zum Einstrom von

K^+ -Ionen und damit zu einer Depolarisation. Es kommt zur Aktivierung eines Aktionspotentials.

Andererseits kann die Zelle langfristig depolarisiert werden indem man den potentialabhängigen Na^+ -Kanal irreversibel durch ein Alkaloid Veratridin öffnet (Kilpatrick et al., 1981). Die Aktivität des Ca^{2+} -Kanals kann ebenfalls durch spezifische Substanzen verändert werden. Das Dihydropyridin BayK8644 erhöht den Einstrom von Ca^{2+} indem es die durchschnittliche Öffnungszeit des Ca^{2+} -Kanals verlängert (Kokobun and Reuter, 1984). Das Dihydropyridin Nifedipin hingegen blockiert den potentialabhängigen Ca^{2+} -Kanal (Hess and Tsien, 1984). Wichtig dabei ist zu bemerken, daß diese Dihydropyridine nur einen Typ von Ca^{2+} -Kanälen, die L-Kanäle, blockieren (Hess and Tsien, 1984). D600 und Verapamil blockieren ebenfalls potentialabhängige Ca^{2+} -Kanäle, aber nicht nur L-Kanäle. Co^{++} hingegen blockiert alle Typen von Ca^{2+} -Kanälen, auch solche die nicht potentialabhängig sind. Ein weiteres wichtiges Werkzeug zur Rolle des Ca^{2+} ist das divalente Ion Ba^{2+} . Ca^{2+} -Kanäle sind permeabler für Ba^{2+} als für Ca^{2+} und inaktivieren langsamer in der Anwesenheit von Ba^{2+} (Hille, 1984; Hess and Tsien, 1984). Zusätzlich blockiert Ba^{2+} einen Ca^{2+} -induzierten K^+ -Kanal und provoziert damit eine Membran-Depolarisierung (Hille, 1984; Armstrong and Taylor, 1980; Suprenant, 1982).

Mittels solcher Manipulationen wurde die Rolle der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle in der Regulation der Genexpression von PENK untersucht.

Ergebnisse

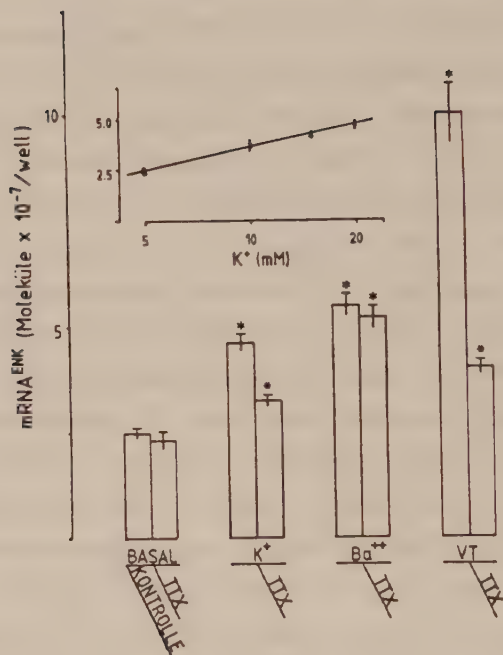
Abb.14 zeigt den Einfluß von depolarisierenden Agentien wie

KCl, Veratridin, und Ba^{2+} auf PENK-mRNA-Spiegel in chromaffinen Zellen nach 48-stündiger Behandlung.

KCl (5-20 mM) induziert eine dosisabhängige Steigerung der PENK-mRNA-Spiegel, die durch Veratridin (VT, 5 μ M) noch übertroffen wurde (4 bis 6 facher Anstieg) (Abb. 14a). Abb. 14b zeigt eine Northern Blot Analyse der PENK-mRNA aus KCl- und Veratridin-behandelten Zellen. Abb. 15 zeigt einen RNA-Blot mit Veratridin (5×10^{-6} M) in dem der Film länger belichtet worden ist um eventuelle PENK-mRNA Vorläufer zu identifizieren. Inkubation mit Ba^{2+} (1 mM) führte ebenfalls zu einer mehr als 2fachen Erhöhung der PENK-mRNA. Durch Koinkubation mit Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) konnte gezeigt werden, daß die Veratridin induzierte Stimulierung nahezu aufgehoben werden kann, und daß die KCl-Stimulation zu 70% inhibierbar ist. Der Ba^{2+} -Effekt hingegen ist TTX-insensitiv (Abb. 14). Untersuchungen zur Rolle des Ca^{2+} -Kanals sind in Abb. 16 gezeigt. Keiner der Ca^{2+} -Kanal-Blocker oder -Aktivatoren hat einen Eigeneffekt auf die PENK-mRNA-Spiegel, wie auch TTX. D600 (50 μ M) inhibiert jedoch nahezu zu 100% die KCl (20 mM) und Veratridin (5 μ M)-induzierte PENK-mRNA-Erhöhung. BayK8644 (10^{-7} M) hingegen potenziert den KCl-Effekt. Der Ba^{2+} -vermittelte PENK-mRNA-Anstieg, obwohl TTX-insensitiv, wird durch die Blocker Verapamil (50 μ M) und Co^{++} vollends aufgehoben.

Um eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Spiegel zu bewirken, wurden die Zellen mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 (10^{-7} M) inkubiert. Abb. 17 zeigt, daß eine 48 hr. Behandlung, eine ca. 2-fache Erhöhung der PENK-mRNA-Spiegel bewirkt.

a)



b)



Abb.14: Effekt depolarisierender Agentien auf die PENK-mRNA-Spiegel und dessen Aufhebung durch TTX (10^{-6} M). a) Zellen wurden 48hr. mit KCl (20 mM), $BaCl_2$ (Ba^{2+} , 1 mM) und Veratridin (VT, 5×10^{-6} M) behandelt. Die kleine Grafik zeigt die Dosis-Wirkungskurve bei Depolarisierung mit 5-20 mM K^+ . Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus je 6 Kulturen, nach Hybridisierung in Lösung mit der M13-cDNA-Sonde. * = signifikant ($P < 0.01$) im Vergleich zur Kontrolle, = signifikant $P < 0.01$ mit Vergleich zur jeweiligen Stimulierung (Einseitige Varianzanalyse, Newman-Keul-Test. b) "Northern-Blot"-Analyse der PENK-mRNA von K^+ - und VT-behandelten Kulturen. C = Kontrolle. Gesamtnukleinsäuren aus 10^6 Zellen wurden elektrophoretisch getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit der ^{32}P -cDNA-Sonde hybridisiert.

Abb. 15: "Northern Blot" Analyse der PENK-mRNA und ihren Vorläufern aus VT behandelten (Spalte 1) und Kontrollzellen (Spalte 2).

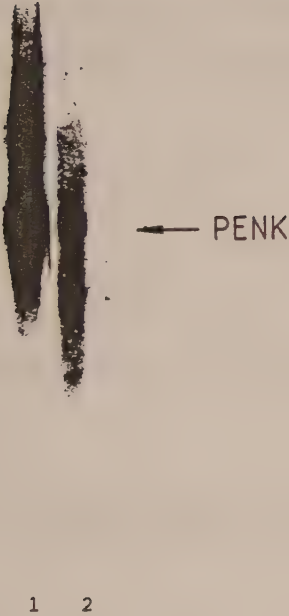


Abb. 16: Modulation der K^+ - (20 mM), Ba^{2+} (1 mM), VT (5×10^{-6} M) induzierten PENK-mRNA durch die Ca^{2+} -Kanal Blocker D600 (5×10^{-5} M), (VP, Verapamil (5×10^{-5} M), Co^{++} (1 mM) und den Ca^{2+} -Kanal-Agonisten BayK8644 (10^{-7} M). Zellen wurden 48 Std mit K^+ - und VT, und 24 Std mit Ba^{2+} und Co^{++} behandelt. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus je 6 Kulturen nach Hybridisierung in Lösung. Statistik siehe Abb. 1.

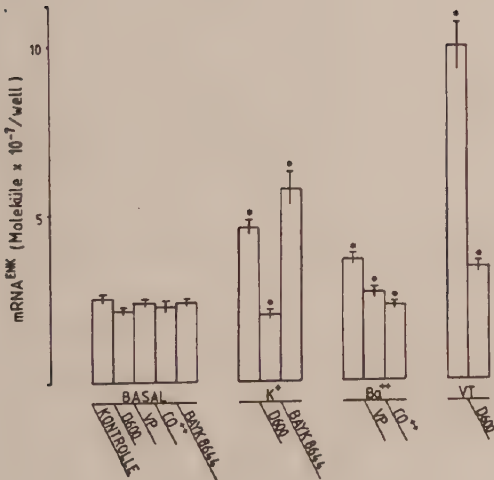


Abb. 16

Tabelle 1: Effekt der K^+ -Depolarisation auf Zell- und Medium-Gehalt immunoreaktiver Opioidpeptide.

Zellgehalt	Kontrolle	8.8 ± 0.8 pmol/well
	20mM K^+ -	25 ± 2.4 pmol/well

Gehalt im Medium	Kontrolle	0.5 ± 0.02 pmol/well
	20mM K^+ -	2.3 ± 0.2 pmol/well

Tabelle 2: Abhängigkeit der Konzentration der PENK-mRNA und der immunreaktiven Opioidpeptide im Gewebe und Medium vom Alter der Kultur (in serumfreien Medium).

Zeit (hr)	PENK-mRNA (Moleküle $\times 10^{-6}$ /well)	ir-Opioidpeptide (pmol/well)	
		Zellgehalt	Mediumgehalt
8	27	-	-
24	24	8.4 ± 1.6	0.2 ± 0.02
48	25	8.8 ± 2.2	0.5 ± 0.06
72	23	10.0 ± 2.0	0.7 ± 0.05

Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.D. von 8 Kulturen.

Tabelle 1 zeigt, daß Depolarisierung der chromaffinen Zellen auch zu einer erhöhten Freisetzung der von PENK abstammenden Opioidpeptiden führt (2.5fach). Ebenfalls sind die Gewebespiegel von immunoreaktiven Opioidpeptiden erhöht (3fach).

Kontrollen

Gesamt De-novo-RNA-Synthese wurde durch ^3H -Uridin Incorporation gemessen und deutet darauf hin, daß der Anstieg der PENK-mRNA nicht auf eine generelle Aktivierung der Transkription zurückzuführen ist (Kontrolle: $1418 \pm 155 \times 10^2$ cpm /well, Veratridin: $1694 \pm 177 \times 10^2$ cpm/Well). Weiterhin, Gesamt DNA- und RNA-Spiegel bleiben unverändert.

Die PENK-mRNA-Spiegel und intrazelluläre Opioidpeptid Spiegel in Kontroll-Zellen bleiben über die Inkubationszeit hinweg konstant (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu steigen während der Anwachsphase der Zellen (ersten 24 Std. nach Ausplattierung) die PENK-mRNA Spiegel 2-3 fach (nicht gezeigt), erreichen dann aber ein Plateau. Es ist also besonders wichtig, daß Experimente erst nach dieser Phase durchgeführt werden und die Zellen, in Bezug auf die PENK mRNA Spiegel sich wieder ein dynamischen Equilibrium befinden. Dasselbe trifft auf die Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA zu (Dr. S. Saadat, Martinsried, persönliche Mitteilung).

Diskussion

Eine Reihe von Untersuchungen haben gezeigt, daß elektrische Stimulierung, Membran-Depolarisierung durch KCl, Veratridin und Ba^{2+}

zu einer akuten Freisetzung von Katecholaminen und Opioidpeptiden aus chromaffinen Zellen führen (Kilpatrick et al., 1981; Livett et al., 1981; Viveros et al., 1979; Ito et al., 1979). Der Einstrom von Ca^{2+} durch den potentialabhängigen Ca^{2+} -Kanal spielt dabei eine zentrale Rolle in der Stimulus-Sekretion Reaktion (Douglas, 1966). Experimente mit Ca^{2+} -Ionophoren und mit permeabilisierten chromaffinen Zellen haben weiterhin eindeutig gezeigt, daß Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Freisetzung regulieren können (Wilson and Kirshner, 1983, Brooks and Trembl, 1983; Ahne-Hilger et al., 1985). In dieser Untersuchung wurde gezeigt, daß Membranbrandepolarisierung auch langzeitige Reaktionen auslösen kann, indem es die Genexpression des PENK beeinflusst und zur erhöhten Biosynthese und Freisetzung von Opioidpeptiden über Tage hinweg führt.

Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration bis zu 20 mM führen in den chromaffinen Zellen zu einer dosis-abhängigen Membranpotential-Veränderung (Friedman et al., 1985). In diesem Konzentrationsbereich wird auch die Aktionspotentialfrequenz erhöht. Bei höheren Konzentrationen (>35mM) kommt es jedoch zu einer schnellen (Sek. Min.) Inaktivierung des Na^+ Kanals und zur kurzzeitigen Aktionspotential-Modulation (Kidokoro and Ritchie, 1980). Um eine andauernde Aktivitätserhöhung der chromaffinen Zelle zu erzielen wurden aus diesem Grund Konzentrationen an KCl bis zu 25 mM verwendet. In der Tat deutet die Inhibierbarkeit des KCl Effekts durch die PENK-mRNA Spiegel durch TTX darauf hin, daß Aktivierung potential-abhängigen Na^+ -Kanals eine wichtige Rolle in der depolarisations-induzierten PENK-mRNA-Expression spielt.

Diesselbe Folgerung kann aus den Experimenten mit dem Alkaloid Veratridin gezogen werden. Öffnung des potentialabhängigen Na^+ -Kanals durch Veratridin erzeugte eine massive Stimulierung der PENK-mRNA Expression. Dieser Effekt scheint über eine erhöhte Transkription des PENK-Gens zu laufen, zumal eine erhöhte Synthese von PENK-mRNA-Vorläufern stattfindet. Obwohl nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, daß VT auch andere Ionenkanäle moduliert (Romey und Lazdunski, 1982), unterstreicht die nahezu totale Inhibition durch den spezifischen Blocker TTX die Funktion des Na^+ -Kanals in der Induktion der PENK-mRNA Expression.

Der einleitende Na^+ -Einstrom während eines Aktionspotentials führt zur Öffnung des potential-abhängigen Ca^{2+} - Kanals. In der Induktion der PENK-mRNA scheint diese Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals eine zentrale Rolle zu spielen. Eine Erhöhung der PENK-mRNA durch KCl und VT konnte durch Koinkubation mit Ca^{2+} -Kanal Blockern aufgehoben werden. Zusätzlich wurde die KCl- Stimulierung durch den Ca^{2+} -Kanal-Agonisten BayK8644 weiter potenziert. BayK8644 alleine hatte kein Effekt. Dies ist wahrscheinlich auf die depolarisations-abhängige Interaktion des Dihydropyridins mit dem L-Kanal (Garcia et al., 1984) zurückzuführen, und deutet ebenfalls darauf hin, daß der Einstrom an Ca^{2+} - während eines Aktionspotentials die PENK-Gen-Expression modulieren kann.

Um die Rolle des Ca^{2+} in der PENK-Induktion näher zu untersuchen, wurden die chromaffinen Zellen mit dem divalenten Ion Ba^{2+} inkubiert. 1 mM Ba^{2+} führte zu einer Erhöhung der PENK-mRNA-Spiegel, die nicht durch TTX blockierbar war. Eine mögliche, durch Ba^{2+} induzierte Membrandepolarisierung scheint daher in diesem Fall keine Rolle zu spielen. Der Ba^{2+} -Effekt konnte jedoch durch Ca^{2+} -Kanal-

blocker aufgehoben werden. Der Effekt von Ba^{2+} auf die PENK-mRNA Spiegel ist wahrscheinlich auf eine erhöhte Permeabilität des Ca^{2+} Kanals zurückzuführen (Ba^{2+} verlangsamt die Inaktivierung des Ca^{2+} Kanals), zumal Ba^{2+} selbst anscheinend nicht für Ca^{2+} in der Induktion der Proenkephalin mRNA substituieren kann (Washek et al. 1987). Es scheint also, daß ein Einstrom von Na^{+} -Ionen nicht eine direkte Voraussetzung für eine Induktion der PENK-Gen-Expression darstellt. Dies ist bestätigt durch den Befund, daß das Ca^{2+} -Ionophor A23187 die PENK-mRNA-Spiegel signifikant erhöht, d.h. eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen ist der Schlüssel zur Modulation der PENK-Gen-Expression durch Membrandepolarisierung.

Durch Messung immunoreaktiver Opioidpeptide konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese von Opioidpeptiden durch KCl stimuliert wird. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Erhöhung des PENK-mRNA-Spiegel zurückzuführen, obwohl ein erhöhtes posttranslationales Prozessieren des PENK-Peptid-Vorläufers durch eine Modulation der Aktivität der prozessierenden Enzyme ebenfalls dazu beitragen könnte. Erhöhung der elektrischen Aktivität durch Membrandepolarisierung scheint also über eine erhöhte PENK-mRNA Expression die Opioidpeptid-Synthese und -Freisetzung über Tage zu verändern. In Abb. 18 sind die Ergebnisse nochmals in einem hypothetischen Modell zusammengefaßt.

Studien an anderen Zelltypen haben gezeigt, daß Ca^{2+} -Ionen die Aktivität der Adenylat-Zyklase verändern können (Rasmussen and Barrett, 1984). Eiden et al. (1984) haben ebenfalls gezeigt, daß das "second messenger" cAMP die Proenkephalin-Gen-Expression erhöhen kann. Es bleibt nun die Frage, ob der Einstrom von Ca^{2+} über ein

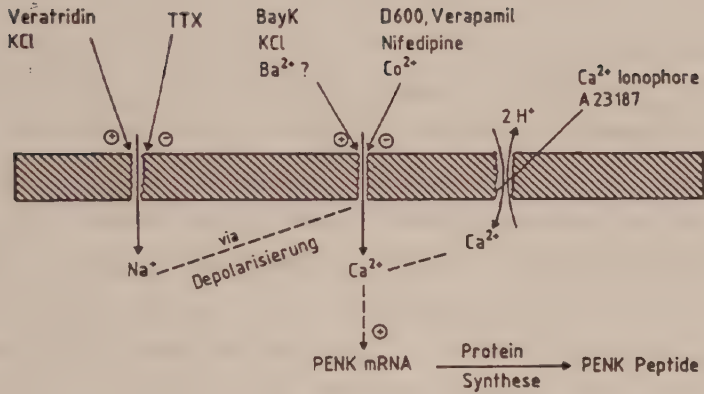


Abb. 18: Schematische Darstellung der Mechanismen, über die depolarisierende Agentien die Proenkephalin-mRNA- und Peptid-Synthese steuern.

cAMP unabhängigen Weg die PENK-Gen Expression moduliert, oder eine indirekte Erhöhung intrazellulärer cAMP Spiegel den Effekt Ca^{2+} vermittelt. Diese Frage wird, unter anderem, in den folgenden Abschnitten analysiert.

III.3. Rezeptor- und "Second-Messenger"-regulierte Ionenkanäle in der Modulation der PENK-Gen-expression

Einleitung

In Abschnitt III.2. dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine depolarisations - induzierte Aktivierung potentialabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle die PENK-Genexpression steuern kann. In vivo mag eine Veränderung der elektrischen Aktivität der chromaffinen Zellen durch Rezeptorbindung des Neurotransmitters Azetylcholin hervorgerufen werden. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor ist selbst ein Na^+ -durchlässiger-Kanal, so daß Aktivierung des Rezeptors einen massiven Einstrom von Na^+ -Ionen bewirkt. Dies führt zu einer Depolarisierung und zur Aktivierung potentialabhängiger Ionenkanäle. Ein weiteres Rezeptor-Transduktionssystem, durch das die elektrische Aktivität reguliert werden kann, ist das Adenylatzyklase System. In-vivo und In-vitro Versuche haben gezeigt, daß die cAMP-abhängige Proteinkinase sowohl potentialabhängige Na^+ - als auch Ca^{2+} -Kanäle phosphorylieren kann und dadurch sehr wahrscheinlich ihre Aktivität verändert (Curtis and Catterall, 1985; Costa et al., 1982; Dunlap, 1985). Die Rolle des cAMP-Systems und dessen Modulation der elektrischen Aktivität in der Induktion der Proenkephalin Genexpression wurde in der folgenden Arbeit untersucht. Weiterhin wurde die Rolle von Ca^{2+} - und cAMP in der nikotinischen Rezeptorinduktion untersucht.

Ergebnisse

Induktion der PENK-mRNA durch Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors und der Adenylatzyklase

Abb. 19 zeigt, daß Nikotin ($10 \mu\text{M}$) eine zeitabhängige Induktion der PENK-mRNA bewirkt, die nach 48 Stunden einen Maximalwert erreichen scheint. Dieser Anstieg wird durch den nikotinischen Rezeptorantagonisten blockiert (48 Stundenwert, Kontrolle $100 \pm$ d-Tubocurarin ($4 \times 10^{-7} \text{M}$) $95 \pm 4\%$, Nikotin, $240 \pm 7\%$, Nikotin + d-Tubocurarin $105 \pm 5\%$, angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) $\pm$ S.E.). Aktivierung der Adenylat-Zyklase-Aktivität liefert ein ähnliches Bild. Eine direkte Stimulierung der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase durch Forskolin bewirkt einen dosis-abhängigen ($10 \mu\text{M}$) und zeitabhängigen ($25 \mu\text{M}$, 0-3 Tage) Anstieg der PENK-mRNA Spiegel. Ein vergleichbares Ergebnis zeigt eine "Northern-Blot"-Analyse (Abb. 20).

Der Nikotinische Rezeptor: Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle

Abb. 21 zeigt die Abhängigkeit der nikotinischen Induktion der Aktivierung potentialabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} - Kanäle. Der Ca^{2+} -Kanal Blocker D600 (siehe Abschnitt III. 4. Abb. 30) und Nifedipin hemmen den Anstieg der PENK-mRNA jeweils zu ca. 100% und 50%. Der Ca^{2+} -Kanal-Agonist BayK8644 hingegen potenziert den Effekt von Nikotin um ca. 50%. Tetrotoxin, ein Blocker des potent spannungabhängigen Na^+ -Kanals, bewirkt keine Veränderung der PENK-mRNA in der Anwesenheit von Nikotin. Eine ähnliche inhibitorische

stimulatorische Wirkung auf den, durch Nikotin induzierten, Einstrom von radioaktiven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ haben D600, Nifedipin und BayK8644 (Tabelle 3).

Modulation potentialabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle durch cAMP

Abb. 22 und 23 zeigen die Abhängigkeit der durch Forskolin ($10 \mu\text{M}$, 48 Std.) und durch 8BrcAMP (1 mM, 48 Std.), einem stabilen cAMP-Analog, induzierten PENK-mRNA von der Aktivierung potentialabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle.

Abb. 22 zeigt, daß Verapamil ($50 \mu\text{M}$) und/oder Nifedipin ($10 \mu\text{M}$) den Forskolin und 8BrcAMP vermittelten Anstieg (nach 3 Tagen gemessen) der PENK-mRNA um ca 40% inhibieren. Bay K8644 hingegen potenziert den 8BrcAMP-Effekt um 50%. Diese Potenzierung wird durch Nifedipin aufgehoben. Weiterhin wurden die Spiegel freigesetzter Opioidpeptide im Kulturmedium bestimmt. Dazu wurde der monoklonale Antikörper E7 verwendet. Ein ähnliches Muster wie auf der PENK-mRNA-Ebene tritt auf. Eine erhöhte Freisetzung durch Forskolin (ca. 2-fach) und 8BrcAMP (ca. 2-fach), die durch Nifedipin inhibiert wird, BayK8644 hebt diese Inhibition auf.

Untersuchungen zur Rolle des Na^+ -Kanals ergaben folgende Ergebnisse: Sowohl die Forskolin-, als auch die 8BrcAMP-Induktion der PENK-mRNA konnte durch TTX zu ca. 50% aufgehoben werden. Koinkubation mit Ca^{2+} -Kanal-Blockern Verapamil (VP) und Nifedipin zeigte, daß die TTX- und VP/ Nifedipin-Inhibition auf der PENK-mRNA-Ebene nicht additiv sind (Abb. 23). Die Freisetzung von Opioidpeptiden wurde ebenfalls durch TTX inhibiert.

Effekt des Ca^{2+} -Ionophor A23187 auf die PENK-mRNA-Spiegel

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von Ca^{2+} - und cAMP in der

nikotinischen Induktion der PENK-mRNA wurde der Effekt von A23187 auf die PENK-mRNA Spiegel in Kontrollzellen und in Nikotin/oder 8BrcAMP-stimulierten Zellen gemessen.

Abb. 24 zeigt, daß 48 stündige Inkubation mit A23187 (10^{-7} M) zu einer ca. 2-fachen Stimulierung der PENK-mRNA führt. Dieser Effekt bleibt in 8BrcAMP stimulierten Zellen erhalten (Effekte sind additiv, ca. 4 fach), ist jedoch nicht additiv mit dem Nikotin-induzierten Anstieg.

Regulation der cAMP Spiegel

Zur Frage, ob durch einen Einstrom von Ca^{2+} - intrazelluläre cAMP-Spiegel verändert werden, wurden die cAMP-Spiegel in KCl (20mM)- und Veratridin (10^{-6} M)-stimulierten Zellen gemessen, und auf ihre Sensitivität zu Verapamil untersucht.

Tabelle 4 zeigt, daß eine Langzeitstimulierung (48 Std.) Stimulierung der Zellen mit KCl und Veratridin, wie auch Verapamil, keine Veränderung in den cAMP-Spiegeln bewirkte. Forskolin hingegen, welches als Kontrollstimulans verwendet wurde, führte zu einer 4-10-fachen Erhöhung der cAMP-Spiegel, die ebenfalls nicht signifikant durch Verapamil blockiert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden nach kurzzeitiger (45 Min.) Inkubation erhalten (nicht gezeigt).

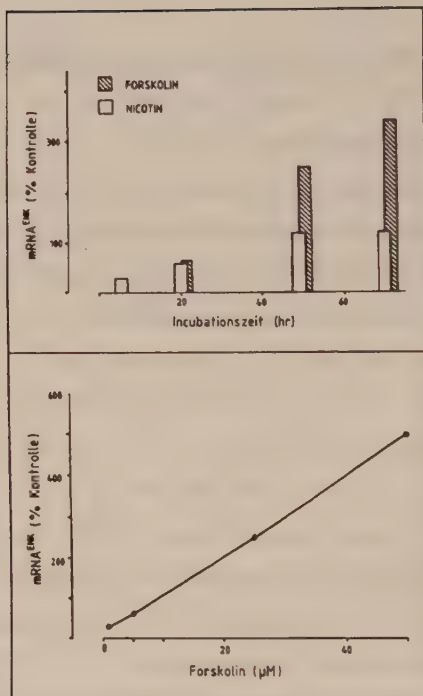


Abb.19: Zeit- und dosis-abhängige (gemessen nach 48 Std.) Induktion der PENK-mRNA⁵ durch Nikotin (10^{-5} M) und Forskolin (25 μM). Angegeben sind Mittelwerte aus je 6 Kulturen.

Abb. 20

Abb.19

Abb. 20: "Northern-Blot"-Analyse von Penk mRNA aus Nikotin und Forskolin stimulierten chromaffinen Zellen. a) NC (10^{-5} M): Nikotin, FK (25 μM): Forskolin, C: Kontrolle. Die Behandlung der Zellen betrug 48 Std.

C FK NC

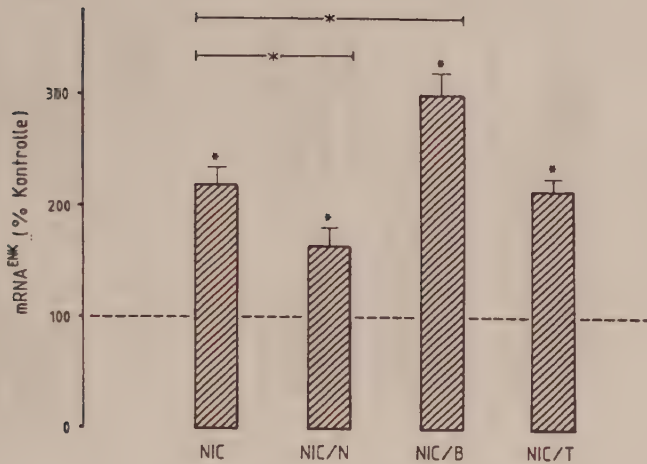


Abb. 21: Modulation der Nikotin (10^{-6} μ M)-induzierten PENK-mRNA durch Na^+ - und Ca^{2+} -Kanal-Blocker oder -Agonisten. Nic: Nikotin, N: Nifedipin (10^{-6} M) B: BayK8644 (10^{-6} M). Die Behandlung der Chromaffinzellen dauerte 48hr. Angegeben sind Mittelwerte + Standardabweichung aus je 6 Kulturen. signifikant $p < 0.05$ in Vergleich zur Kontrolle, * signifikant $p < 0.05$ in Vergleich zur Nikotinstimulierung (Einseitige Varianzanalyse, Newman-Keul's Test).

Tabelle 3: Einfluß von Ca^{2+} -Kanal Modulatoren auf die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (gemessen nach 48 Std. Behandlung). Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standard Error aus je 4 Kulturen.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ - Aufnahme (% Kontrolle)	
Kontrolle	100 $\pm$ 5
Nikotin	191 $\pm$ 14
Nikotin/D600	119 $\pm$ 15
Nikotin/Nifedipin	117 $\pm$ 16
Nikotin/BayK8644	267 $\pm$ 21
K^+	210 $\pm$ 5
K^+ /BayK8644	431 $\pm$ 36

Abb. 22

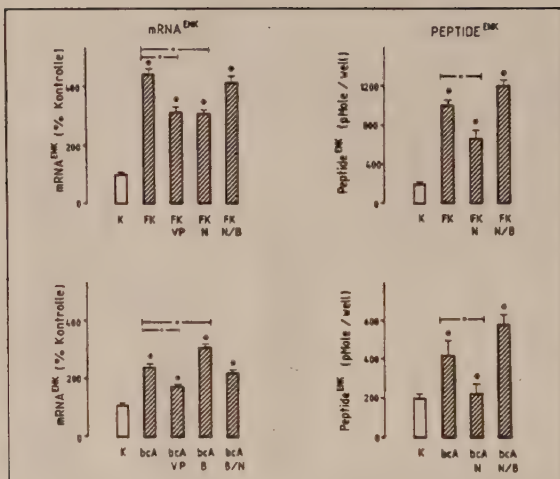
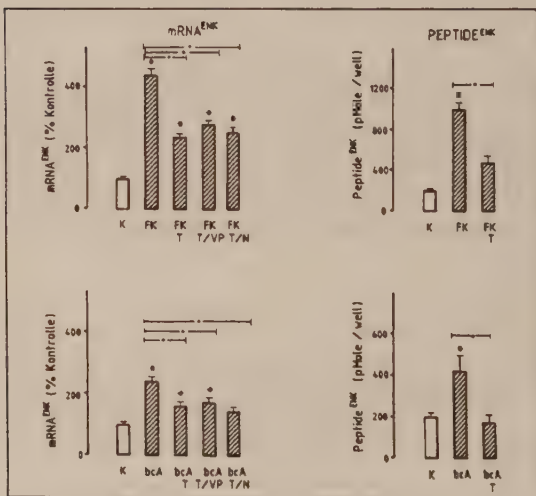


Abb. 23



Abhängigkeit des Forskolin-(25 μ M) und 8BrcAMP-(1 mM) Effekts auf die PENK-mRNA-Expression und Opioidpeptidfreisetzung, von der Aktivierung potentialabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle: K: Kontrolle, FK: Forskolin, bca: 8BrcAMP, VP: Verapamil (5×10^{-6} M), N: Nifedipin (10^{-6} M), B: BayK8644 (10^{-6} M), T: TTX (10^{-6} M). Die Behandlung der Zellen betrug 72 Std. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus je 6 Kulturen. Statistik siehe Abb. 21.

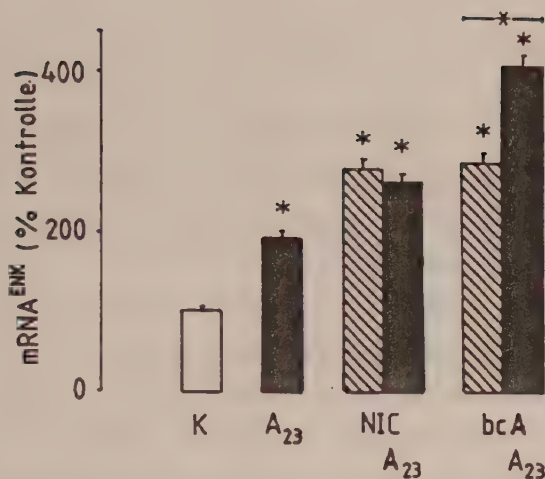


Abb. 24: Einfluß des Ca^{2+} -Ionophor A23187 (10^{-7} M) auf die PENK-mRNA in Nikotin- ($10 \mu\text{M}$) und 8BrcAMP-(bcA, 1mM) stimulierten chromaffinen Zellen. (Behandlung der Zellen betrug 48 Std.). Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus je 4 Kulturen. Statistik siehe Abb. 3.

Tabelle 4: Einfluß von Forskolin und depolarisierender Agentien auf die intrazellulären cAMP Spiegel nach 48 hr. Behandlung. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standard Error aus je 4 Kulturen.

	cAMP (pmol/well)
Kontrolle	0.44 ± 0.04
Forskolin (25×10^{-6} M)	6.3 ± 0.2
Forskolin/Verapamil	5.67 ± 0.3
Verapamil/ 5×10^{-5} M)	0.39 ± 0.04
KCl (20mM)	0.34 ± 0.02
Veratridin (5×10^{-6} M)	0.47 ± 0.03
Veratridin/Verapamil	0.42 ± 0.03
Nikotin (10^{-5} M)	0.46 ± 0.02
Nikotin/Verapamil	0.39 ± 0.05

Diskussion

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, daß Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors und Erhöhung intrazellulärer cAMP Spiegel die PENK-Genexpression über eine Modulation potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle regulieren.

Depolarisierung der chromaffinen Zellen, z.B. durch KCl und Veratridin, bewirkt eine Aktivierung von Na^{+} - und Ca^{2+} -Kanälen und erhöht somit die elektrische Aktivität (Friedman et al., 1980; Whittaker, 1981). Ebenso ist gezeigt worden, daß Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors zu einer Membran-Depolarisierung führt (Douglas, 1968; Kidokoro and Ritchie, 1980; Biales et al., 1976). Obwohl die Induktion der PENK-mRNA-Expression durch Nikotin von der Aktivierung potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle abhängig ist, konnte jedoch der Anstieg der PENK-mRNA nicht durch den Na^{+} -Kanalblocker TTX aufgehoben werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei Nikotinkonzentrationen, die höher als 1 μM sind, der potential-abhängige Na^{+} -Kanal sehr schnell inaktiviert (Kidokoro und Ritchie, 1980), aber der Na^{+} -Einstrom durch den Azetylcholinrezeptor selbst ausreicht, um die Ca^{2+} -Kanäle zu aktivieren. Daher konnte der Anstieg der PENK-mRNA durch D600 und durch die Dihydropyridine Nifedipin und BayK8644 moduliert werden, nicht aber durch TTX. Eine ähnliche TTX-Insensitivität wurde für die Katecholaminfreisetzung (Kilpatrick et al., 1981; Kidokoro and Ritchie, 1980) und den $^{22}\text{Na}^{+}$ und $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Wade et al., 1981) an Nikotin stimulierten chromaffinen Zellen berichtet. Bei 10 μM Nikotin konnte weder die Freisetzung von Katecholaminen noch $^{22}\text{Na}^{+}$ - und $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch TTX inhibiert werden.

Anders hingegen wird die PENK-mRNA Expression der PENK- mRNA durch cAMP reguliert. In diesem Fall war die Induktion durch Forskolin und 8BrcAMP von der Aktivierung sowohl potential-abhängiger Na^+ - als auch Ca^{2+} -Kanäle abhängig. Biochemische und elektrophysiologische Experimente haben gezeigt, daß die cAMP-abhängige Proteinkinase Ca^{2+} -Kanäle phosphorylieren und dessen Aktivität regulieren kann (Curtis and Catterall, 1985; Costa et al., 1982; Dunlap, 1985). Der molekulare Mechanismus, wodurch cAMP jedoch die Ca^{2+} - Aufnahme in der chromaffinen Zellen reguliert, und dadurch die PENK Gen Expression moduliert, ist noch unklar. Der Befund, daß die Stimulierung der PENK-mRNA-Spiegel über Forskolin und 8BrcAMP durch TTX inhibiert wurde, und diese Inhibition nicht additiv mit der der Ca^{2+} -Kanalblocker war, deutet darauf hin, daß der Effekt möglicherweise durch eine Aktivierung der Na^+ -Kanäle und einer erhöhten elektrischen Aktivität der chromaffinen Zellen vermittelt wird.

In den hier gezeigten Experimenten wurde die PENK-mRNA Induktion nach 3 Tagen gemessen. Eine Möglichkeit der Regulierung der PENK-mRNA Expression durch cAMP könnte daher auch eine Induktion, De-novo-Synthese, von Na^+ - oder anderen -Ionenkanälen einschließen, wobei der Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen indirekt über eine erhöhte Anzahl an Kanälen induziert würde. Andererseits könnten auch die Synthese von Protein(en), die in der Modulation von Ionenkanälen eine Rolle spielen, zur Langzeit-Regulation der PENK-mRNA beitragen haben. Erste Experimente deuten darauf hin, daß die TTX-Sensitivität der cAMP-induzierten PENK-mRNA-Expression tatsächlich erst nach 24 Stunden zum Ausdruck kommt, was auf eine solche Form der Regulierung hindeutet (Abb. 25). Weitere Experimente

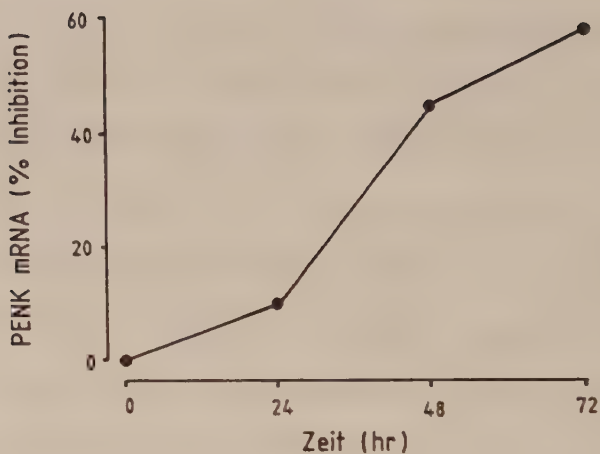


Abb. 25: Zeit-Abhängigkeit der Forskolin vermittelten PENK-mRNA-Induktion von der Aktivierung potentialabhängiger Na^+ Kanäle. Forskolin ($25\mu\text{M}$) und TTX (10^{-6} M) wurden gleichzeitig den chromaffinen Zellen hinzugegeben und die PENK-mRNA nach 24, 48 und 72 Std. bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus je 4 Kulturen.

dazu sind noch erforderlich. Eine langzeitige Regulierung der elektrischen Aktivität durch cAMP wurde vor kurzem für Aplysia Neuronen berichtet (Dale et al., 1987).

cAMP scheint aber auch die PENK-mRNA-Expression über direkte, Ca^{2+} -Kanal unabhängige, Mechanismen zu regulieren, da die Inhibition durch Verapamil und TTX nur ca. 40% beträgt. Dieser intrazellulär vermittelte Effekt muß noch genauer untersucht werden. Hinweise auf eine direkte Regulation der Proenkephalin Genexpression durch cAMP-abhängige Mechanismen, wurden kürzlich durch Gentransfer-Experimente erhalten (Comb et al., 1987). Durch Transfektion des menschlichen Proenkephalin-Gens in CV 1 (Affen-Fibroblasten)-Zellen, konnte eine cAMP-Sensitivität verleihende Sequenz auf dem Gen identifiziert werden.

Das cAMP-System scheint jedoch keine große Rolle in der nikotinischen Induktion der PENK-mRNA in den chromaffinen Zellen zu spielen, obwohl berichtet wurde, daß kurzzeitige Stimulierung der Zellen durch Nikotin zu einer 1.5-2-fachen Erhöhung der cAMP-Spiegel führt (Kumakura und Costa, 1979; Eiden et al., 1984). Die unterschiedlichen Mechanismen der PENK-mRNA Regulation durch nikotinische Rezeptoraktivierung und cAMP führen zur Annahme, daß der geringe Anstieg an cAMP infolge der Stimulierung des Rezeptors nicht in erster Linie zur Induktion beiträgt. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch den Ca^{2+} -Ionophor A23187 provoziert eine Stimulierung der PENK-mRNA-Spiegel, die mit der 8BrcAMP - nicht aber mit der nikotinischen - Induktion, additiv ist. Dieser Befund führt ebenfalls zur Annahme, daß eher Ca^{2+} als cAMP der primäre Mediator des nikotinischen Effektes ist.

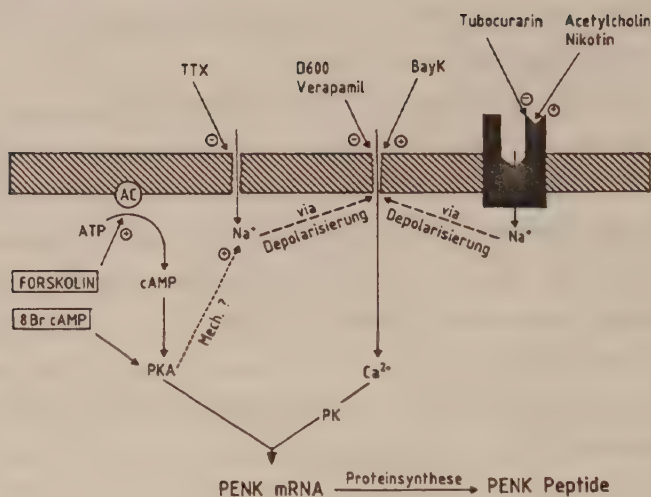


Abb. 26: Schematische Darstellung der Mechanismen über die cAMP und der nikotinische Azetylcholinrezeptor die PENK-mRNA Expression regulieren. AC: Adenylatzyklase, PKA: Proteinkinase A, PK: andere möglichen (Ca²⁺-abhängige) Proteinkinasen, Mech. : Mechanismus unbekannt.

In Abschnitt III.2. dieser Arbeit bestand die Frage ob ein Einstrom an Ca^{2+} indirekt die PENK-mRNA Expression durch eine Erhöhung der cAMP-Spiegel induzieren kann. Depolarisierung durch KCl und Veratridin, Stimuli die beide den Ca^{2+} - Einstrom erhöhen, führten jedoch nicht zu einer Modulation der cAMP Spiegel (auch nicht nach 45 min. Behandlung, nicht gezeigt). Ein Einstrom von Ca^{2+} scheint also die PENK-mRNA Expression nicht durch eine Modulation intrazellulärer cAMP Spiegel zu beeinflussen. Demnach kann zusammenfassend gesagt werden, daß Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors und des Adenylatzyklase-Systems die PENK-Gen-Expression durch eine Modulation von Ca^{2+} - und/oder Na^{+} -Kanälen regulieren. Der molekulare Mechanismus der Induktion jedoch läuft unterschiedlich ab. Die Langzeit Freisetzung von Opioidpeptiden durch Nikotin und cAMP wird in ähnlicher Weise reguliert und ist abhängig von der Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen. cAMP bewirkt nur eine schwache akute Freisetzung von Katecholaminen und Opioiden (Kilpatrick et al., 1981; Eiden et al., 1984), was wiederum darauf schließen läßt, daß cAMP und Ca^{2+} die Biosynthese und Freisetzung von Opioidpeptiden durch eine Induktion der Genexpression langfristig verändern können. Abb. 26 zeigt schematisch eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

III.4. Der Histamin Rezeptor und das Phosphatidylinosit System in der Regulation der PENK Genexpression

Einleitung

Der Transfer von Information durch Transmitter und Hormone zu intrazellulären Enzymen und Proteinen ist abhängig von einer Anzahl

verschiedener rezeptor-abhängiger SignalTransduktionsmechanismen. In den Abschnitten III.2. und III.3. wurde die Rolle der Ca^{2+} -Kanäle und des Adenylatzyklase-Systems in der PENK-Gen-Expression untersucht. Eine Reihe von Untersuchungen in den letzten Jahren hat weiterhin gezeigt, daß Neurotransmitter und Hormone die zu einer Ca^{2+} -Mobilisierung (Ca^{2+}_i) führen, ihre Signalübermittlung durch Aktivierung einer Phosphodiesterase (Phospholipase C) einleiten können (Williamson and Hansen, 1987). Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt zur Hydrolyse von Inosit-Phospholipiden in der Plasmamembran. Im Gegensatz zum Adenylat-Zyklase System, das nur einen "Second messenger", cAMP, verwendet, generiert das Phosphatidylinositol-System mindestens zwei "Second Messenger" mit verschiedenen Funktionen. Das Inosit-1,4,5-triphosphat (IP_3) provoziert die Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Berridge, 1987; Berridge and Irvine, 1984). Diacylglycerin (DAG) hingegen spielt die Hauptrolle in der Aktivierung einer phospholipidabhängigen Proteinkinase in der Plasmamembran, der Proteinkinase C (PKC) (Kikkawa and Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1984). Stimulierung des Inosit-Metabolismus führt also nicht nur zur Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel und Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen durch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (z.B. Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige PK), sondern auch zur Phosphorylierung von Proteinen, was eine Aktivierung der PKC bewirkt.

Die Suche nach Rezeptoren auf der chromaffinen Zelle, die mit dem Phosphatidylinositol (PI)-System gekoppelt sind würde die Einsicht in die Mechanismen der Proenkephalin Gen Expression erweitern. Der muskarine Azetylcholinrezeptor ist zum PI-System gekoppelt (Fish et al., 1981), aktiviert jedoch keine PENK-m

Expression (Eiden et al., 1984). Vor kurzem konnten Mitarbeiter aus unserem Labor zeigen, daß der H_1 -Histaminrezeptor auf der chromaffinen Zelle zum PI System gekoppelt ist (Noble et al., 1986). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Aktivierung des H_1 -Rezeptors auch zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und der Freisetzung und Biosynthese von Opioidpeptiden führt (Bommer et al., 1987). Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde zunächst die Rolle des Histaminrezeptors in der Induktion der PENK-mRNA untersucht. Abschnitt IV berichtet dann über die Funktion der "Second Messengers" IP_3 und DAG in der PENK-Gen-Expression.

Histamin interagiert im zentralen Nervensystem mit drei bekannten Rezeptorsubtypen, dem H_1 -, H_2 - und H_3 -Rezeptor (Prell and Green, 1986; Schwartz et al., 1980; Arrang et al., 1987). Aktivierung des H_1 -Rezeptors führt zur cGMP-Akumulation, PI Hydrolyse, und in manchen Zellen zur Stimulierung von Ca^{2+} -Kanälen. Aktivierung der Adenylat-Zyklase wird durch den H_2 -Rezeptor vermittelt. Der H_3 -Rezeptor, erst kürzlich charakterisiert, übernimmt die Funktion eines präsynaptischen Autorezeptors (Arrang et al., 1987).

In dieser Arbeit wurde die Rolle des H_1 -Rezeptors, im Vergleich zum muskarinen Azetylcholinrezeptors, in der PENK-mRNA-Expression untersucht.

Ergebnisse

Inkubation chromaffiner Zellen mit Histamin bewirkt einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg der PENK-mRNA-Expression. Im Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-5} M bewirkt es einen progressiven Anstieg der PENK-mRNA-Spiegel (Abb. 27). Abb. 28 zeigt eine "Northern-Blot"-Analyse der PENK-mRNA von Kontrollen und Histamin (10^{-5} M, 48 Std.) - behandelten Zellen. Abb. 29 zeigt die Zeitabhängigkeit der Histamin (10^{-5} M)-Induktion. Nach 8-stündiger Inkubation ist ein ca. 3-facher Anstieg zu messen, der bei 24 Stunden nahezu einem maximalen Wert erreicht hat (82% vom Maximalwert, 8 Std.).

Zur weiteren Charakterisierung des Histamin-Effekts wurde der Rezeptortyp bestimmt. Die Zellen wurden 48 Stunden mit Histamin (10^{-5} M) und jeweils dem H_1 -Antagonisten Clemastin und dem H_2 -Antagonisten Cimetidin inkubiert. Abb. 27 zeigt daß Clemastin (10^{-7} M) den Histamin-induzierten Anstieg der PENK-mRNA vollständig blockiert. Cimetidin hingegen bewirkte keine Veränderung. Keiner der beiden Substanzen hatte einen Eigeneffekt auf die PENK-mRNA. Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Induktion wurde die Rolle potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle untersucht und mit dem nikotinischen Azetylcholinrezeptor verglichen. Abb. 30 zeigt eine 44%ige Inhibition des Histamin Effekts durch den Ca^{2+} -Kanal-Blocker D600 ($10\mu M$). Das Dihydropyridin Nifedipin (10^{-7} M) reduzierte den PENK-mRNA Anstieg zu 33%. (Kontrolle $100 \pm 5\%$, Nifedipin $67 \pm 5\%$, $n=6$, $X \pm S.E.M.$). Die Induktion der PENK-mRNA durch Nikotin (10^{-6} M) wird durch D600 zu 100% inhibiert (Abb. 30). Abb. 30 zeigt

Abb. 27

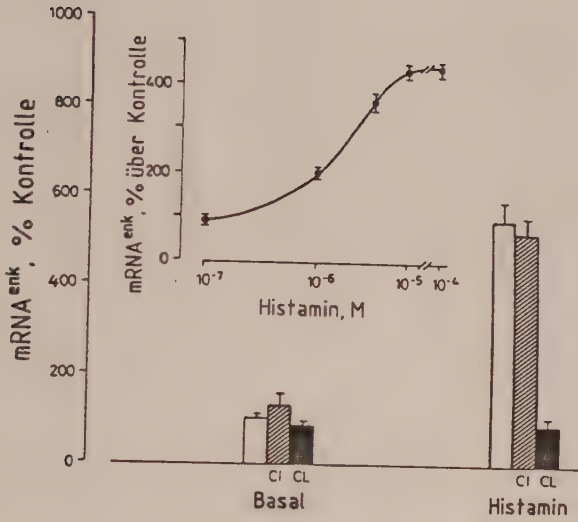


Abb. 28



Abb. 29:

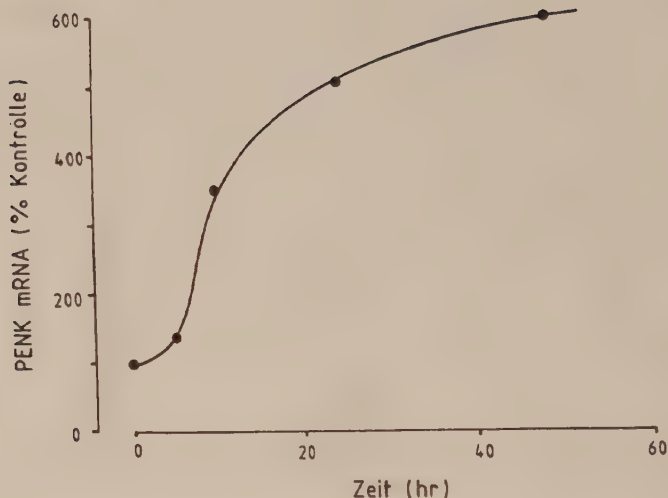


Abb. 27: Dosis-Wirkungskurve und Rezeptorselektivität des Histamins auf die PENK-mRNA Expression, gemessen nach 48 stündiger Behandlung. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus je 4 Kulturen, CI (10^{-7} M): Cimetidin (H_2 -Antagonist), CL (10^{-7} M) Clemastin (H_1 -Antagonist).

Abb. 28: "Northern-Blot" von PENK-mRNA von Histamin (10^{-5} M, 48 stündiger Behandlung) behandelten Zellen.

Abb. 29: Zeitverlauf der PENK-mRNA Induktion durch Histamin (10^{-5} M).

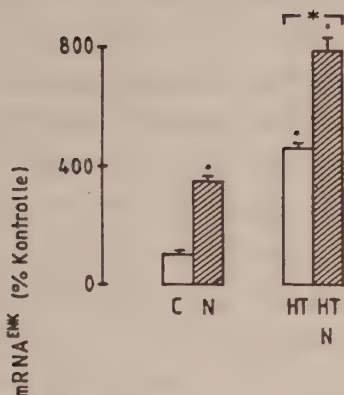


Abb. 30: Vergleich der Abhängigkeit der Histamin (10^{-5} M) und Nikotin (10^{-5} M) Induktion der PENK-mRNA von der Aktivierung potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. (48 Std. Behandlung). C= Kontrolle, N: Nikotin, HT: Histamin, D600 (10^{-5} M). Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M. Statistik, siehe Abschnitt II, Abb. 2, S. .

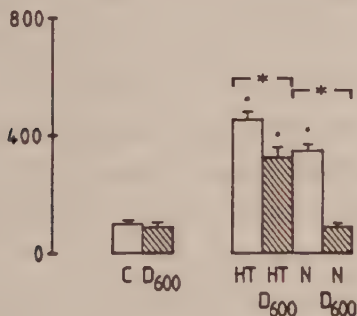
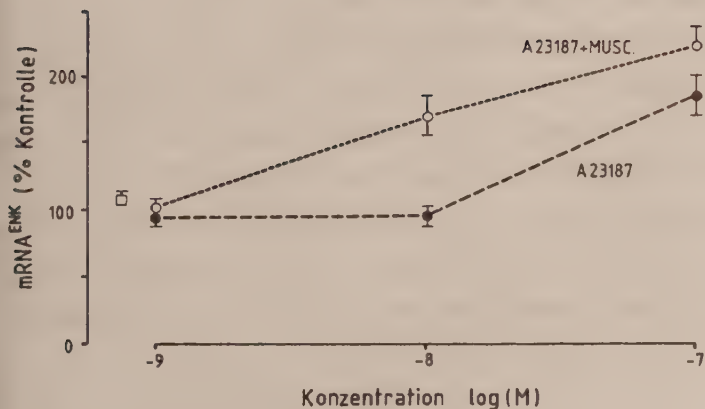


Abb. 31: Synergistischer Einfluß von Muskarin (10^{-5} M) und dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 auf die PENK-mRNA, gemessen nach 48 stündiger Behandlung durch Hybridisierung in Lösung. Angegeben sind Mittelwerte aus je 4 Kulturen (+Standardabweichung).
 : Muskarin (10^{-5} M)
 o : A23187
 o : A23187 + Muskarin (10^{-5} M)

Abb. 31



weiterhin, daß die Nikotin- ($10\ \mu\text{M}$) und Histamin ($10^{-5}\ \text{M}$)-Effekte auf die PENK-mRNA additiv sind.

Wie der H_1 -Rezeptor, ist auch der muskarine Azetylcholinrezeptor mit dem PI-System verbunden. Zum Vergleich wurde der Effekt von Muskarin auf PENK-mRNA gemessen. Abb. 31 zeigt, daß Muskarin bei $10^{-5}\ \text{M}$ keinen Effekt hat. Wird Muskarin ($10^{-5}\ \text{M}$) jedoch mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 ($10^{-8}\ \text{M}$) koinkubiert, steigen die PENK-mRNA Spiegel um 80% (Abb. 31). Ebenso potenziert Muskarin die Nikotin-Induktion der PENK-mRNA (nicht gezeigt).

Diskussion

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß Aktivierung des H_1 -Rezeptors und, unter bestimmten Bedingungen, auch des muskarinen Azetylcholinrezeptors zu einer Induktion der PENK-mRNA-Expression führt.

Ähnlich wie im zentralen Nervensystem bewirkt der H_1 -Rezeptor in der chromaffinen Zelle eine Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen. Die Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen vermittelt zum Teil die Induktion der PENK-mRNA-Expression. Im Gegensatz zur nikotinischen Induktion konnte jedoch der Effekt auf die PENK-mRNA durch D600 nur zu einem Teil aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, daß der H_1 -Rezeptor die PENK-Gen-Expression noch über ein anderes "Second Messenger"-System reguliert. Ein wahrscheinlicher Kandidat dafür ist das PI-System, das zum H_1 -Rezeptor gekoppelt ist. Andererseits bewirkt die Stimulierung des muskarinen Rezeptors, der auch zum Phosphatidylinositol-System gekoppelt ist (Fischer et al., 1981), keine PENK-mRNA-Induktion. Dieser Unterschied könnte jedoch darauf beruhen,

der muskarine Rezeptor viel weniger effizient in der Stimulierung der PI-Hydrolyse ist (Noble et al., 1986), DAG und IP_3 daher in geringen Konzentrationen synthetisiert werden und die PKC nicht genügend stimuliert wird, und/ oder daß eine Mobilisierung intrazellulären Ca^{2+} nicht ausreichend erfolgt. In der Tat bewirkt Muskarin in Kombination mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 einen leichten Anstieg der PENK-mRNA. Ebenfalls potenziert Muskarin die Nikotin-Induktion der PENK-mRNA. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in diesem Zustand die Proteinkinase C (siehe Abschnitt III.5.), ein Ca^{2+} -abhängiges Enzym, genügend aktiviert ist, oder aber, falls zusätzlich andere Ca^{2+} - abhängige Proteinkinasen (z.B. Ca^{2+} /Calmodulin PK) eine Rolle spielen, die Ca^{2+} - Spiegel eine für die Induktion kritischen Spiegel erreicht haben. Der Befund, daß Muskarin im Gegensatz zu A23187 (siehe Abschnitt III.3.) die Nikotin stimulierte PENK-mRNA potenziert, deutet darauf hin, daß dieser Effekt wahrscheinlich über eine Stimulierung der PKC durch DAG läuft (siehe Abschnitt III.5.). Die Additivität des Nikotin- und Histamin-Effektes auf die PENK-mRNA mag ebenfalls zum Teil auf eine erhöhte Stimulierung der PKC durch Ca^{2+} - und DAG zurückzuführen sein. In diesem Fall würden die zwei rezeptor-gekoppelten "Second-Messenger"-Systeme auf der Ebene der PKC interagieren ("Cross Talk"). In vivo mag daher Azetylcholin die PENK-Gen-Expression über den nikotinischen als auch muskarinen Rezeptor regulieren. Eine ähnliche kooperative Interaktion wurde von Pollard und Kollegen berichtet, die die Freisetzung von Katecholaminen von chromaffinen Zellen untersucht haben (Forsberg et al., 1986).

Es ist unwahrscheinlich, daß cAMP in der Histamin-Induktion eine Rolle spielt, zumal der Effekt über den H_1 -Rezeptor vermittelt wird. Hinzu kommt, daß Histamin die cAMP- Spiegel nicht verändert (M. Bommer, T. Costa, persönliche Mitteilung). Ebenso unwahrscheinlich ist es, daß eine mögliche Erhöhung der cGMP Spiegel die PENK-mRNA Induktion beigetragen haben, da cGMP die PENK-mRNA-Spiegel in chromaffinen Zellen nicht verändert (Quach et al., 1984).

Histamin wird von Mastzellen synthetisiert und freigesetzt. Zumal die Nebenniere mit der peripheren Blutzirkulation in Kontakt ist, ist es möglich das Histamin zusätzlich zur synaptischen Freisetzung von Azetylcholin, ein wichtiger humoraler Regulator chromaffiner Zellen ist. Die Additivität der Histamin und Nikotin Induktion der PENK-mRNA unterstreicht dies. Histamin wird bei allergischen Reaktionen von Mastzellen freigesetzt, und eine Interaktion mit den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (zentrales Organ in der physiologischen Reaktion zu Stress) könnte eine wichtige physiologische Funktion haben.

III.5. Multiple Regulation der Proenkephalin-Genexpression durch die Proteinkinase C

Einleitung

Inositolphospholipide (IP_g) werden von 2 verschiedenen Typen Enzymen hydrolysiert, den Phosphomonoesterasen und ei

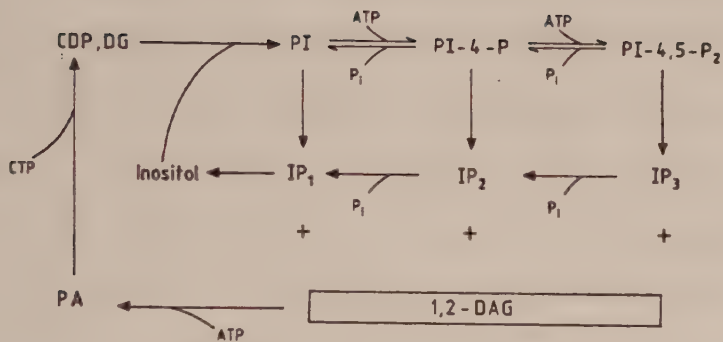


Abb. 32: Schematische Darstellung des PI (Phosphatidylinosit)-Zyklus.

Phosphodiesterase, der Phospholipase C (Berridge, 1987). Die Phosphomonoesterasen entfernen selektiv die Phosphate in der 4- und 5-Position des Inositrings und formen Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu PI-4-Phosphat (PIP) und PI, das ungefähr 95% des gesamten Inositphospholipid-Pools darstellt, um. PI- und PIP-Kinasen sorgen für die Umformung zu PIP_2 . Die Phospholipase C hydrolysiert alle drei Inositphospholipide und führt zur Synthese von 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inosit-1-phosphat Ins-1-P, Ins (1,4) P_2 und Ins (1,4,5) P_3 , jeweils von PI, PIP und PIP_2 (Abb. 32). Der PI-Zyklus wird dadurch geschlossen, daß DAG zu Phosphatidsäure (PA) metabolisiert wird und anschließend zu Cytidin-5-Diphosphat-DAG (CDP-DAG) welches mit Inosit im Endoplasmatischen Retikulum zu PI kondensiert.

PI ist der Präkursor für PIP und PIP_2 . PIP und PIP_2 sind in erster Linie die hormon-sensitiven Pools. Die vorwiegende Hydrolyse von Polyphosphoinosit-Lipiden (d.h. PIP und PIP_2) durch die Phospholipase C ist durch die schnellere Akkumulation von IP_3 und IP_2 , im Vergleich zu IP_1 , angedeutet. Das PI-Pool kann aber auch durch freies intrazelluläres Ca^{2+} reguliert werden. Ein verzögertes Abbau von PI, sekundär zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung durch Ins (1,4,5) P_3 , scheint über die Phospholipase C vermittelt werden (Majerus et al., 1985), nicht über die PI-Kinase, wie ursprünglich von Berridge (1984) vorgeschlagen. Durch den von Majerus et al. vorgeschlagenen Mechanismus würde demnach viel mehr DAG relativ zu IP_3 synthetisiert werden. Weiterhin, DAG kann auch durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin entstehen, was über eine PAF-aktivierte Phospholipase C vermittelt wird. Die physiologische Signifikanz dieser verschiedenen Inositphospholipid-Substrate für die Phospholipase C ist, daß dadurch die zwei sekundären Mediatoren

DAG und IP_3 differentiell reguliert werden können, d.h. eine Mobilisierung von Ca^{2+} kann zeitlich von einer Aktivierung der Proteinkinase C durch DAG dissoziiert sein.

In Abschnitt III.4. wurde erwähnt, daß das PI-System in der H_1 induzierten PENK-mRNA-Expression möglicherweise involviert ist. Die Rolle von Ca^{2+} in der Regulation der Genexpression ist in den ersten 3 Abschnitten untersucht worden. In diesem Abschnitt wurde die Rolle der PKC in der PENK-mRNA Regulation ermittelt.

In einer nicht erregten Zelle, ist die PKC hauptsächlich in der löslichen (cytoplasmatischen) Fraktion in der inaktiven Form vorhanden (Nishizuka, 1984). Die Aktivität des Enzyms ist abhängig von Ca^{2+} und sauren Phospholipiden, hauptsächlich Phosphatidylserin. Eine Reihe von syn 1,2 Diacylglycerine bewirken eine physiologische Aktivierung der Proteinkinase C indem sie die Affinität des Enzyms für Ca^{2+} erhöht, so daß eine Aktivierung ohne einen Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} stattfindet. Die PKC wird auch direkt durch "tumor promoting" Phorbolster aktiviert, indem sie die Bindung des Enzyms an die Plasmamembran fördern. In dem Modell von Wolf (1985) ist die Bindung der PKC an die Membran Ca^{2+} -abhängig, und die Aktivatoren erhöhen in erster Linie die Affinität des Enzyms für Ca^{2+} , und fördern dadurch die Bindung und Aktivierung des Enzyms.

Mittels dieser Aktivatoren wurde die Rolle der PKC, und der Interaktion von PKC und Ca^{2+} -abhängigen regulatorischen Mechanismen, in der PENK-mRNA Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Aktivierung der PKC die PENK-mRNA Expression sowohl positiv als auch negativ regulieren kann, über Mechanismen, die von der elektrischen Aktivität, Ca^{2+} -Kanalaktivität und Phospholipase C Aktivität abhängen.

Ergebnisse

Aktivatoren der PKC stimulieren die PENK-mRNA

Abb. 33 zeigt, daß Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) eine dosisabhängige (10^{-9} - 10^{-7} M) Steigerung der PENK-mRNA-Spiegel induziert. Analog dazu, erhöhen die Phorbolester Phorbol-Didecanoat (PDD) und Mezerein die PENK-mRNA. Abb. 34a,b zeigt die Zeitabhängigkeit dieser Effekte (PDD, 10^{-6} , 10^{-7} M, 0-48 Std. - Mezerein 10^{-7} M, 0-48 Std.). Nach 4 1/2 Stunden konnte schon ein leichter Anstieg gemessen werden, der bei 10 Stunden schon ca. 70% des maximalen Wertes (zwischen 24-48 Std.) erreichte. Das inaktive Phorbol-Ester 4 α -Phorbol-12, 13-Didecanoate (4 α PDD) hatte keinen Effekt. Zur weiteren Charakterisierung der PKC konnte gezeigt werden, daß die Effekte auch durch exogene synthetische Diacylglycerine herbeigeführt werden können. Abb. 34a zeigt, daß das DAG-Analog 1-Oleoyl-acetyl-glycerin (DAG, 10^{-5} M) nach 24 Std. Inkubation, die PENK-mRNA Spiegel fast auf das 2-fache erhöht. Abb. 34b zeigt eine "Northern-Blot"-Analyse der Mezerein (10^{-7} M) induzierten PENK-mRNA.

Interaktion von Ca^{2+} - und Phorbolester

Um eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - Spiegel (Ca^{2+}_i) zu simulieren, wurden die Zellen mit dem Ca^{2+} - Ionophor A23187 behandelt. Abb. 33 zeigt eine Dosis-Wirkungskurve im Bereich von 10^{-9} - 10^{-7} M. Erst bei 10^{-7} M konnte ein signifikanter Anstieg der PENK-mRNA gemessen werden. Höhere Konzentrationen wurden nicht

verwendet auf Grund möglicher zytotoxischer Nebeneffekte, die bei höheren Konzentrationen als $10\mu\text{M}$ auftreten können. Wird A23187 jedoch mit TPA oder PDD koinkubiert, potenziert es bei einer unterschwelligen Konzentrationen (10^{-9} M, 10^{-8} M) den Phorbol ester induzierten Anstieg der PENK-mRNA (Abb. 33 und 35).

cAMP und Ca^{2+}

Um zu bestimmen ob der TPA-Effekt auf die PENK-mRNA Spiegel über eine Interaktion mit dem cAMP oder Plasmamembran- Ca^{2+} -Aufnahme ("Uptake") Systeme (Ionenkanäle, aktive Ca^{2+} -Transportsysteme) zurückzuführen ist, wurden cAMP und $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Akumulationsexperimente durchgeführt. Abb. 36 zeigt, daß TPA (5×10^{-8} M) die intrazellulären cAMP Spiegel, kurzzeitig (45 min.) und langfristig (24, 48 Std.) nicht verändert. Als Kontrollstimulus wurde Forskolin verwendet. Nach 45 min konnte ein 4-5-facher Anstieg gemessen werden. Ebenfalls ist die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - Akumulation in TPA behandelte Zellen nicht verändert (Abb. 37).

Regulation der PENK-mRNA in depolarisierten Zellen

Eine starke Induktion der PENK-mRNA wurde durch den Ca^{2+} -Kanal-Agonisten BayK8644 (10^{-6} M, 48 Std.), der die Durchschnittsöffnungszeit von potential-abhängigen L-Kanälen erhöht (Hess and Tsien, 1984), provoziert. Die Affinität von BayK8644 für den Ca^{2+} -Kanal ist abhängig von dessen basaler Aktivität aufweisen (Hess und Tsien, 1984; Garcia et al., 1986), d.h. die Zellen müssen eine kritische basale Aktivität, damit das Dihydropyridin effektiv mit dem

Ca^{2+} -Kanal interagieren kann. Aus diesem Grund wurden die Zellen in niedrigen Konzentrationen an KCl (10 mM) inkubiert, um die basale Aktivität der chromaffinen Zellen zu steigern. KCl (10 mM) allein induzierte einen 35%igen Anstieg der PENK-mRNA. Durch die Inkubation von KCl und BayK8644 wurden hohe PENK-mRNA-Spiegel erreicht.

Der Effekt von BayK8644 auf die PENK-mRNA ist dosisabhängig. K^+ (10 mM)/BayK8644 (10^{-7}M): $300 \pm 25\%$ des Kontrollwerts, K^+ (10 mM) (BayK8644 (10^{-6}M): $575 \pm 32\%$ des Kontrollwerts, $n=4$, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Interessanterweise inhibiert TPA (10^{-9} - 10^{-7}M) den K^+ /BayK8644 Effekt auf die PENK-mRNA. Abb. 38 zeigt die inhibitorische Wirkung von TPA. Eine maximale Inhibition wurde bei 10^{-8}M erreicht. Bei höheren Konzentrationen steigen die Spiegel wieder an ($>10^{-8}\text{M}$). Es ist noch unklar weshalb TPA (10^{-8}M) die PENK-mRNA Spiegel auf den basalen Wert, nicht aber auf den durch 10^{-7}M TPA erreichbaren Wert (siehe Abb.33), reduziert. Eine mögliche Veränderung der PKC Sensitivität zu TPA in depolarisierten Zellen mag der Grund dafür sein.

Eine Inhibition durch TPA wurde ebenfalls in Zellen gemessen, die durch KCl (20 mM) alleine stimuliert wurden (nicht gezeigt). Hingegen hat TPA ($5 \times 10^{-8}\text{M}$) zu keiner signifikanten Veränderung des PENK-mRNA Spiegels in 8Br-cAMP (0.5 mM; 24 Std.) stimulierten Zellen geführt, was darauf schließen läßt, daß der inhibitorische Effekt von TPA nicht unspezifisch ist (Abb. 39).

Modulation der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation

Zellen wurden wie in den RNA-Experimenten behandelt und

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (5 Min) gemessen. TPA alleine (10^{-8}M , 10^{-7}M) führt zu keiner Veränderung, inhibiert jedoch vollkommen, zu 100%, die K^{+} - (10 mM)/BayK86444 (10^{-6}M) stimulierte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation. TPA 10^{-9}M inhibiert den Effekt zu $60 \pm 5\%$ (S.D.) (Abb. 37).

Modulation der Phosphatidylinosit-Hydrolyse

Zellen wurden mit Myo-2- ^3H -inositol markiert und die Akkumulation von $^3\text{H}\text{-IP}_1$ und $^3\text{H}\text{-IP}_2/\text{IP}_3$ Inositphosphaten nach 30 min. Inkubation mit Histamin (10^{-5}M) gemessen. TPA allein reduzierte die basalen $^3\text{H}\text{-IP}_1$ Spiegel (ca. 50%), nicht aber die $^3\text{H}\text{-IP}_2/\text{IP}_3$ Spiegel. Hingegen blockierte TPA die Histamin (10^{-5}M) provozierte Akkumulation von $^3\text{H}\text{-IP}_1$ und $^3\text{H}\text{-IP}_2/\text{IP}_3$ (Tabelle 5).

Auf der PENK-mRNA-Ebene hat TPA (10^{-8}M) ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die Histamin (10^{-5}M , 24 Std.) Induktion (90% Inhibition) (Abb. 40).

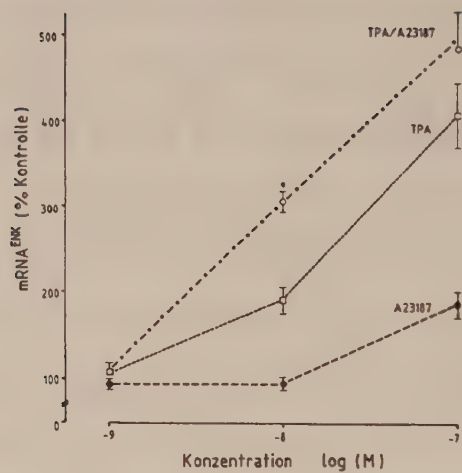


Abb. 33

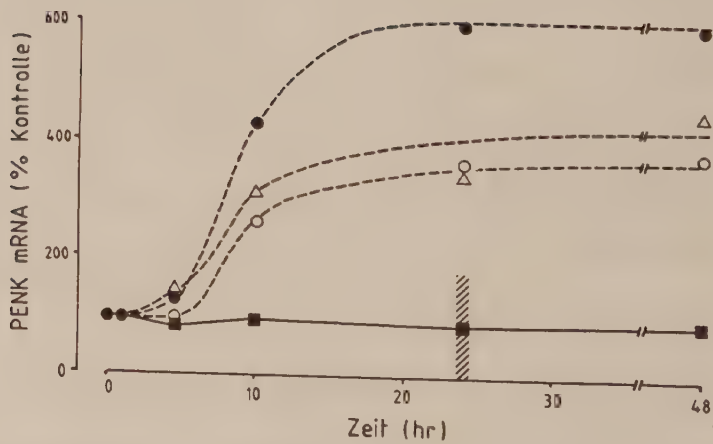


Abb. 34

48 24 10 4.5 .75 C



Abb. 33: Regulation der PENK-mRNA durch Proteinkinase C und Ca^{2+} . Zellen wurden 48 Std. mit TPA (), A23187 (o) und TPA + A 23187 (o) inkubiert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler aus je 4 Kulturen.

Abb. 34a: Zeitverlauf der PENK-mRNA Induktion über Protein-kinase-Aktivatoren (Phorbol ester), d.h. PDD (10^{-6} M, o, 10^{-7} M), Mezerein (10^{-6} M, o), 1-Oleoyl-2-Acetyl-Glycerin (10^{-5} M, γ schraffierte Säule), inaktives PDD, 4 α PDD (10^{-7} M,). Angegeben sind Mittelwerte aus je 4 Kulturen.

Abb. 34b: "Northern-Blot"-Analyse der Mezerein-Induktion der PENK-mRNA. Zeitwerte sind in Stunden angegeben, C=Kontrolle.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Abb. 35: Interaktion von Ca^{2+} -Ionophor A23187 und Phorbol-ester induzierte Effekte auf der Ebene der PENK-mRNA. "Northern-Blot"-Analyse der PENK-mRNA aus Zellen, die für 24 hr mit PDD (10^{-8}M) und A23187 (10^{-8}M), behandelt wurden. Spalten 1: PDD (10^{-8}M), 2-4: Kontrolle, 5: PDD + A23187 (10^{-8}M), 6: PDD + A23187 (10^{-8}M), 7: A23187 (10^{-8}M), 8: A23187 (10^{-8}M) 9: Kontrolle. Pfeil bezeichnet die PENK-mRNA (ca. 1400 Basen).

Abb. 36: Effekt des Phorbol-ester TPA auf die intrazelluläre cAMP Spiegel, TPA ($5 \times 10^{-8}\text{M}$), Forskolin (FK, $25\text{ }\mu\text{M}$). Angegeben sind Werte $\pm$ Standardabweichung, $n = 4$.

Abb. 37: Regulation der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch TPA. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wurde in unbehandelten und KCl (10 mM) / Bay K 8644 (10^{-6}M) behandelte Zellen gemessen. TPA (10^{-7}M , 10^{-8}M). Mittelwerte $\pm$ Standardfehler aus je 4 Kulturen.

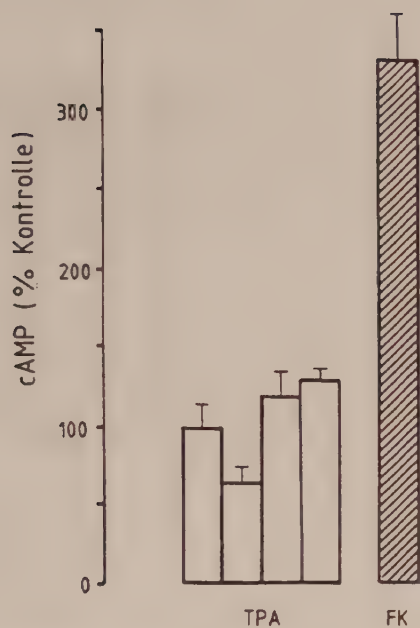
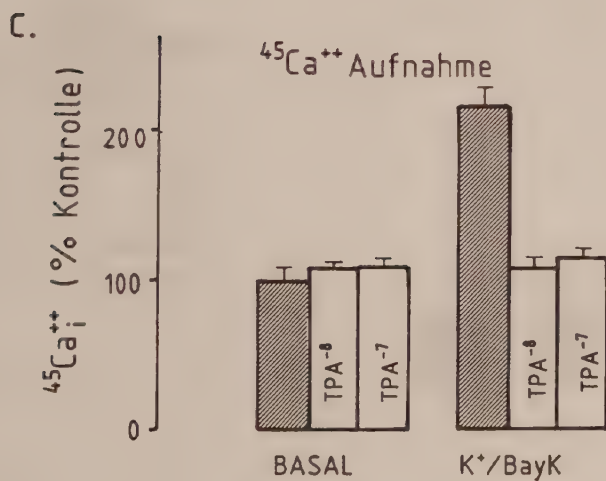


Abb. 36

Inkubationszeit (hr): 0 3/4 24 48 3/4

Abb. 37



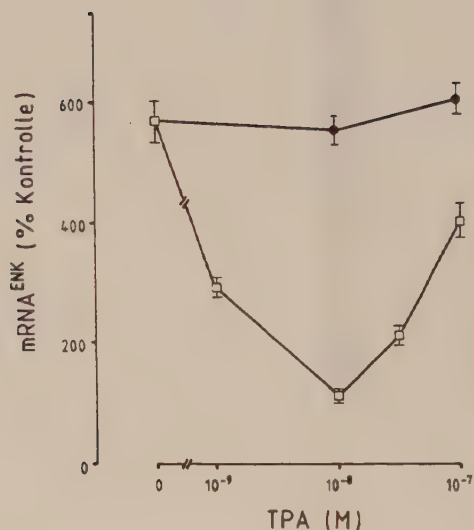


Abb. 38: Inhibition der PENK-mRNA durch TPA in depolarisierten Zellen. Zellen wurden für 48 Std. mit K^+ (10^{-6} mM) / BayK8644 (10^{-6} M) in Ab- und Anwesenheit von TPA (□) und 4aPDD (○) inkubiert. TPA oder 4aPDD wurden 15 min. vor KCl und BayK8644 hinzugegeben. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler, $n = 4$ Kulturen.

1 2 3



Abb. 39

"Northern-Blot"-Analyse von PENK-mRNA aus 8BrcAMP (10^{-8} mM) und TPA (10^{-8} M)-behandelten chromaffinen Zellen (24 Std. Inkubation). Spalten: 1, Kontrolle, 2: 8BrcAMP (10^{-8} mM), 3: 8BrcAMP (10^{-8} mM) + TPA (10^{-8} M).

Tabelle 5e): Regulation der Phosphoinosithydrolyse durch Phorbol ester. $\text{myo-}^3\text{[H]inositol}$ -markierte Zellen wurden 30 Min mit Histamin (10^{-5}M) inkubiert. TPA ($5 \times 10^{-8}\text{M}$) wurde 10 Min. vor Histamin hinzugegeben. Die Hydrolyseprodukte IP_1 , IP_2/IP_3 wurden anschließend bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus je 4 Kulturen.

Behandlung	Inositphosphat (cpm/well)	
	IP_1	IP_2/IP_3
Kontrolle	202.3 $\pm$ 24.9	82.4 $\pm$ 7.3
TPA	98.1 $\pm$ 6.4	80.6 $\pm$ 8.1
Histamin	3327.2 $\pm$ 443.8	249.3 $\pm$ 12.5
Histamin + TPA	118.4 $\pm$ 3.6	90.9 $\pm$ 15.2

Abb. 40

"Northern-Blot"-Analyse von P_{ENK} -mRNA aus HIS (10^{-5}M) und TPA (10^{-8}M) behandelten Zellen (24 Std. Inkubation). CT: Kontrolle, HIS: Histamin.

CT HIS HIS
 +
 TPA

Diskussion

Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten darauf hin, daß die PKC die PENK-Genexpression über multiple Mechanismen reguliert, die von der Aktivität der Ca^{2+} -Kanäle und der Phospholipase C abhängen.

In nicht depolarisierten Zellen führen PKC Aktivatoren wie TPA, PDD, und Mezerein zu einem zeitabhängigen Anstieg der PENK-mRNA. Ebenfalls induzierte ein exogenes 1,2-Diacylglycerin, 1-oleoyl-2-acetyl-glycerin, einen Anstieg der PENK-mRNA. Der Zeitverlauf der Phorbol-Induktion verläuft ähnlich zu dem anderer PENK-mRNA-Aktivatoren, die zum PI-System gekoppelt sind und/oder eine Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel bewirken (z.B. Histamin, Veratridin nicht gezeigt).

Ca^{2+} spielt in der Translokation und Aktivierung der PKC eine wichtige Rolle, und PKC-Aktivatoren wie DAG und Phorbol-ester erhöhen die Affinität des Enzyms für Ca^{2+} . Andererseits könnte eine Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen, durch eine Stimulierung der PKC Translokation, die Affinität des Enzyms für DAG und Phorbol Ester erhöhen (Nishizuka, 1984; Wolf et al., 1985; May et al., 1985; French et al., 1987; Brocklehurst et al., 1985). Auf diese Interaktion von Ca^{2+} - und Phorbol Ester, könnte die potenzierende Wirkung von A23187 und PDD/TPA auf die PENK-mRNA-Expression beruhen. Andererseits ist nicht auszuschließen, daß die A23187 und Phorbol-ester vermittelte Effekte auf einer anderen Ebene in dem Induktionsprozeß interagieren. Eine synergistische Wirkung von PKC und Ca^{2+} scheint auch auf der Ebene der Freisetzung möglich zu sein (Nishizuka, 1984; Brocklehurst et al., 1985; Brocklehurst und Pollard, 1987).

In manchen Zellen wird die PKC Regulierung zellulärer Funktionen, z.B. der Freisetzung, durch eine Interaktion der PKC mit der Adenylat-Zyklase oder Ca^{2+} -Kanälen vermittelt (Abou-Samra et al., 1987; Katada et al., 1985; Kelleher et al., 1984; Bell et al., 1985). Die PENK-mRNA-Expression in den chromaffinen Zellen hingegen scheint nicht über diese Mechanismen moduliert zu werden, da weder die cAMP-Spiegel noch $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch TPA verändert werden.

Anders ist es wenn durch Depolarisation die Aktivität der potential-abhängigen Ca^{2+} -Kanäle erhöht wird. In diesem Fall inhibiert TPA bei niedrigen Konzentrationen (10x niedriger als die für eine stimulierende Wirkung nötigen Konzentrationen) die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch potential-abhängige Ca^{2+} -Kanäle, und blockiert dadurch die durch Ca^{2+} induzierte Stimulierung der PENK-mRNA-Expression. Eine inhibitorische Regulation von Ca^{2+} -Kanälen durch die PKC wurde auch für Pheochromocytoma (PC12)- und Hinterwurzelzellen (Dorsal-root-ganglion, DRG)- Zellen berichtet (Harris et al., 1986; Messing et al., 1986; DiVirgilio et al., 1986; Rane and Dunlap, 1986). Der Abfall der inhibitorischen Wirkung von TPA bei höheren Konzentrationen als 10^{-8} M ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der vom Ca^{2+} -Kanal unabhängige stimulatorische Eigeneffekt von TPA zum Tragen kommt. Die Modulation der PENK-mRNA durch die PKC in chromaffinen Zellen scheint also das Resultat zweier entgegengesetzter Wirkungen zu sein, die von der Aktivität der Zelle bestimmt werden: a) eine potente inhibitorische Wirkung, die auf eine Inhibition des potential-abhängigen Ca^{2+} -Kanal zurückzuführen ist, b) eine vom Ca^{2+} -Einstrom-unabhängige stimulatorische Wirkung, dessen Verlauf noch zu untersuchen ist. Kürzlich ist berichtet worden, daß mehrere PKC-Moleküle existieren (Ohno et al., 1987;

Knopf et al., 1987; Parker et al., 1986). Die inhibitorische und stimulatorische Wirkung von TPA auf die PENK-mRNA könnte daher auch durch verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Affinität zu TPA mediiert werden.

Eine weitere inhibitorische Wirkung der PKC auf die PENK-mRNA tritt auf wenn das PI System in den chromaffinen Zellen aktiviert ist. TPA blockiert die Histamin-induzierte Phosphoinosit-Hydrolyse und $IP_1, IP_2/ IP_3$ -Akumulation. Dies ist im Einklang mit Befunden von Orellana et al. (1987), die ebenfalls über eine Phorbolester-Inhibition der Histamin stimulierten Phosphoinosit-Hydrolyse in 1321-H1-Astrozytoma Zellen berichten. Eine Präinkubation mit TPA verhindert nach dieser Arbeit die Synthese von IP_3 , und die damit vermutlich assoziierte Ca^{2+} -Mobilisierung und die Synthese von DAG. In Abschnitt III.4. wurde gezeigt, daß Aktivierung des H_1 -Rezeptors zur Induktion der PENK-mRNA führt. Dieser Effekt, konnte jedoch nur partiell (44%) durch den Ca^{2+} -Kanal-Blocker D600 aufgehoben werden. Die nahezu vollkommene Inhibition (90%) der H_1 -induzierten PENK-mRNA durch TPA, ist sehr wahrscheinlich auf den zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die Phosphoinosit-Hydrolyse zurückzuführen. Das PI-System scheint also in der Histamin Regulierung der PENK-Genexpression eine wichtige Rolle zu spielen. Es ist noch unklar ob DAG oder IP_3 "Second messenger" die Hauptrolle spielt, oder ob beide in der induktiven (positiven) Signalübermittlung eine Rolle spielen.

Eine akute maximale Stimulierung der PKC durch Phorbolester simuliert nicht immer den Effekt, der durch hormonale Aktivierung des Enzyms durch DAG hervorgerufen wird. Phorbolester, im Gegensatz zu DAG bewirken eine konstante Stimulierung der PKC und dadurch

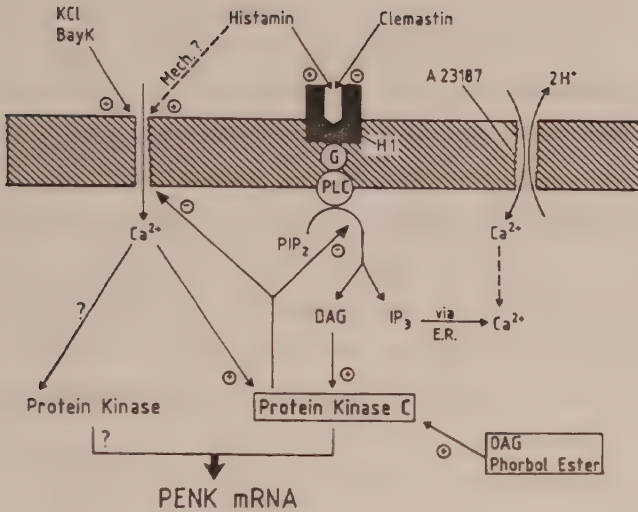


Abb. 41: Schematische Darstellung der möglichen Regulation PENK-mRNA Expression durch die Proteinkinase C. E.R.: endoplasmatisches Retikulum, Mech. : Mechanismus unbekannt.

könnten nicht-physiologische Reaktionen ausgelöst werden. Dennoch konnte auch durch OAG eine Induktion der PENK-mRNA erzielt werden was auf eine physiologische Rolle der PKC in dem stimulatorischen Effekt hindeutet.

Andererseits läßt die sehr hohe Sensitivität zu den inhibitorischen Wirkungen von TPA, sei es auf dem Ca^{2+} -Kanal als auch der Phosphoinositolhydrolyse, ebenfalls vermuten, daß die hormonale Aktivierung der PKC durch DAG eine wichtige Rolle als "negativ feedback"-Modulator in der Regulation der PENK Genexpression spielt.

Der Mechanismus, der für einen negativen Feedback Effekt durch die PKC auf der Ebene der PI-Hydrolyse verantwortlich ist, ist noch unklar. Eine Reihe von Untersuchungen an anderen Zellen haben ähnliche inhibitorische Wirkungen von PKC gezeigt. Zwei mögliche Mechanismen sind vorgeschlagen worden. Sie beziehen sich auf die Hypothese, daß Aktivierung eines Rezeptors zur Dissoziation einer aktiven GTP-bindenden α -Untereinheit von einem spezifischen heterotrimeren G-protein führt, und dadurch die Phospholipase aktiviert wird:

- a) der Rezeptor selbst könnte durch PKC phosphoryliert werden.
- b) Phosphorylierung der α -Untereinheit, d.h. die Phospholipase kann nicht mehr aktiviert werden. In diesem Fall hätte es eine ähnliche Wirkung wie Pertussis-Toxin in der ADP-Ribosylierung von G und Go.

Abb. 41 zeigt schematisch nochmals eine Zusammenfassung der Ergebnisse in einem hypothetischen Modell.

III.6. Abhängigkeit der Proenkephalin-Induktion von der
Proteinsynthese

Präliminäre Experimente mit dem Proteinsyntheseblocker Cycloheximid zeigten, daß die Induktion der PENK mRNA durch Nikotin von der de-novo Synthese von Proteinen abhängt. Abb. 42 zeigt, daß in Anwesenheit von Cycloheximid (10^{-6}M) die Induktion der PENK mRNA durch Nikotin (10^{-5}M) stark reduziert ist (von 4-fach auf 1.7-fach Kontrollspiegel).

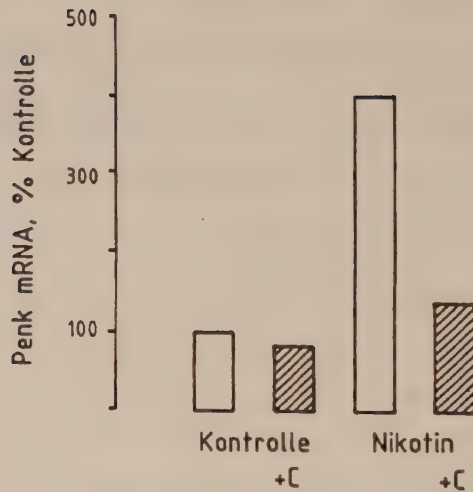


Abb. 42: Hemmung der PENK-mRNA Induktion durch den Protein Syntheseblocker Cycloheximid ($1 \mu\text{M}$). Kontrollzellen und Nikotin (10^{-6}M)-stimulierte Zellen wurden 28 Stunden in Anwesenheit von Cycloheximid (C) inkubiert. PENK-mRNA wurde mittels "Northern-Blot"-Analyse gemessen und durch Densitometrie des Röntgenfilms bestimmt.

Allgemeine Zusammenfassung und Diskussion

Am Modell der Primärkultur der chromaffinen Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit Mechanismen der induktiven Signalübertragung in der Regulation der Opioidpeptid-Genexpression untersucht. Von Bedeutung ist, daß in diesem Modell die chromaffinen Zellen von jeglichem präsynaptischen Einfluß befreit sind und reproduzierbar in einem, durch das Kultursystem bestimmten und definiertem Milieu, gehalten werden können. Es ist dadurch möglich durch spezifische pharmakologische und biochemische Manipulationen den Weg der Informations-Übertragung und -Speicherung zu verfolgen.

Es wurde deutlich, daß eine Reihe von rezeptor-gekoppelten intrazellulären "Second-messenger"-Systemen die PENK-Genexpression steuern, kurz zusammengefaßt:

1. Membrandepolarisierung und Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors und des H_1 -histaminergen Rezeptors führen, über eine Aktivierung potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, zu einer Induktion der PENK-mRNA.

2. Stimulierung der Adenylatzyklase und Steigerung der intrazellulären cAMP-Spiegel induzieren die PENK-mRNA über einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus, aber zum Teil auch über eine Modulation der Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen, welche normalerweise durch das Membranpotential gesteuert werden.

3. Zusätzlich zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und der cAMP-abhängigen Proteinkinase, scheint die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (z.B. durch Aktivierung des H_1 -Rezeptors) die PENK-mRNA Expression auf vielfältige Art und Weise zu regulieren:

- In unbehandelten Zellen bewirkt eine direkte Stimulierung der PK durch Tumor-induzierende Phorbol ester eine Steigerung der PENK-mRNA Spiegel. Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch Inkubation mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 bewirkte eine Potenzierung dieses Effekts. Es ist daher naheliegend zu vermuten, daß Signale, die zu einer Stimulierung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel führen (z.B. Depolarisierung, nikotinische Rezeptoraktivierung), mit Signalen, die zu einer Erhöhung der Diacylglycerin-Spiegel führen (z.B. H_2 Rezeptor-Aktivierung), auf der Ebene der Proteinkinase C konvergieren können und dadurch die PENK-mRNA Expression regulieren. Dieses Phänomen bezeichnet man als "Cross-Talk", und wurde kürzlich für die Wirkungen der Wachstumsfaktoren PDGF (Platelet-Derived Growth-Faktor) und EGF (Epidermal-Growth-Faktor) berichtet (siehe Taylor, 1986).

- Genauere Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase C zeigte weiterhin, daß die PKC auch negativ-regulatorische Wirkungen auf die PENK-mRNA Expression haben kann, wenn es mit zwei bestimmten Signalübertragungssystemen interagiert:

- a) in depolarisierten Zellen reduziert die Proteinkinase C die PENK mRNA Spiegel, was auf eine Inhibition der Aktivität der potential-abhängigen Ca^{2+} -Kanäle zurückzuführen ist.
- b) die Histamin-stimulierte Induktion der PENK-mRNA wird durch Prä-Aktivierung der PKC durch Phorbol ester inhibiert, was sehr wahrscheinlich auch auf eine Inhibition der Ca^{2+} -Kanäle und der Phospholipase C - Aktivität zurückzuführen ist.

Anhand dieser Ergebnisse ist es offensichtlich, daß der Aktivitätszustand der Zelle ein wichtiger Aspekt in der Regulation der Gen-

expression ist. Je nach Aktivitätszustand mag ein und derselbe sekundäre Mediator (z.B. Ca^{2+} und DAG) verschiedene Wirkungen haben. Auf diese Weise könnte z.B. ein Neurotransmitter- oder Hormon durch Aktivierung eines "Second-Messenger"-Systems die Sensitivität der Zelle zu einem zweiten Transmitter (oder Hormon) verändern und dadurch dessen Wirkungsweise modulieren. Mechanismen der Regulation der Genexpression, wie sie hier beschrieben worden sind, spielen sehr wahrscheinlich nicht nur in ausgewachsenen Systemen, sondern auch während Entwicklungs- und Wachstumsphasen eine wichtige Rolle in der neuronalen Plastizität. Vorrausgegangene Experimente haben gezeigt, daß einige dieser Systeme womöglich in der Transdifferenzierung der chromaffinen Zellen eine Rolle spielen (N. Kley, nicht gezeigt).

In den letzten Jahren wurde berichtet, daß einige der oben erwähnten "Second-messenger"-Systeme in der Regulation der c-fos und c-myc Protoonkogen-Genexpression in neuronalen PC12 Zellen (PC12 Zellen sind von chromaffinen Zellen abstammende Tumorzellen) eine Rolle spielen (Greenberg et al., 1986; Morgan und Curran, 1986). Dies ist von großem Interesse, zumal die c-fos und c-myc-Proteine nukleare Transkriptionsfaktoren sind. Aufgrund der Proteinsynthese-Abhängigkeit der PENK-Genexpression könnte man eventuell vermuten, daß solche oder andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Langzeit-Neuropeptidgenexpression spielen. Andererseits könnten auch Faktoren, welche die Neuropeptid-mRNA-Degradation kontrollieren oder rückwirkend "Second-messenger"-Systeme langfristig aktivieren oder inhibieren, in der Regulation beteiligt sein. Mittels moderner molekular- und zellbiologischer Methoden (z.B. Zelltransfektion, Fusionierung von Zellen mit geladenen Liposomen, differentielle

Klonierung) könnten solche Hypothesen untersucht werden. Fortschritte auf diesem Gebiet werden zum Verständnis der Informationsübertragung von der Synapse zur DNA und RNA beitragen, und eine tiefere Einsicht in die Mechanismen der neuronalen Funktion ermöglichen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abou-Samara, A., Harwood, J.P., Manganiella, V.C., Catt, K.J. and Aguilera, G. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 1129-1136
- Ahnert-Hilger, G., Bhakdi, S. and Gratzl, M. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 12730-12734
- Armstrong, C.M. and Taylor, S.R. (1980) *Biophys. J.*, 30, 473-488
- Arrang, J.M., Garbarg, M., Lancelot, J.C., Lecomte, J.M., Pollard, H., Robba, M., Schunack, W. and Schwartz, J.-C. (1987) *Nature*, 327, 117-123
- Aviv, H. and Leder, P. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1408-1412
- Bader, M.F., Ciesielski-Treska, J., Thiersé, D., Hesketh, J.E. and Aunis, D.J. (1981), *J. Neurochem.*, 37, 917-933
- Bell, J.D., Buxton, I.L.O. and Brunton, L.L. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 2625-2628
- Berridge, M.J., Downer, C.P. and Hanley, M.R. (1982) *Biochem. J.*, 206, 587-595
- Berridge, M.J. (1984) *Biochem. J.*, 220, 345-360
- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) *Nature*, 312, 315-321
- Berridge, M.J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 159-195
- Biales, B., Dichler, M., Tischler, A. (1976) *J. Physiol.*, 262, 743-753
- Black, I.B. Adler, J.E., Dreyfus, C.F., Friedman, W.F., LaGamma, E.F. and Roach, A.H. (1987) *Science*, 236, 1263-1268
- Bommer, M., Liebisch, D., Kley, N., Herz, A. and Noble, E.P. (1987) *J. Neurochem.*, 49, 1688-1696

- Brocklehurst, K.W., Morita, K. and Pollard, H.B. (1985) *Biochem. J.* 228, 35-42
- Brocklehurst, K.W. and Pollard, H.B. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, ,
- Bottenstein, J.E. and Sato, G.H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 76, 514-517
- Carmichael, S.W., and Winkler, H. (1986) *Scientific Am.* 253, 30-40
- Chang, K.J. (1984) *Trends in Neurosci.*, 7, 234-235
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W. (1979) *Biochemistry*, 18, 5294-5299
- Civelli, O., Birnberg, N. and Herbert, E. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6783-6787
- Comb, M., Birnberg, N.C., Seasholtz, A., Herbert, E. and Goodman H.M. (1986) *Nature*, 323, 353-356
- Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. and Herbert, (1982) *Nature*, 295, 633-666
- Costa, M.R.C., Casnellie, J.E. and Catterall, W.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 7918-7921
- Cox, K.H., DeLeon, D.V., Angerer, L.M. and Angerer, R.C. (1984) *Dev. Biol.*, 101, 485-502
- Curtis, B.M. and Catterall, W.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 82, 2528-2532
- Dale, N., Kandel, E.R. and Schacher, S. (1987) *J. Neuroscience*, 2232-2238
- DeWied, D. and Joller, J. (1982) *J. Physiol. Rev.*, 62, 976-1059
- Diamond, D. and Goodman, H. (1985) *J. Mol. Biol.*, 181, 41-62
- DiVirgilio, F., Pozzan, T., Wollheim, C.B., Vincentini, L.M. and Meldolesi, J. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 32-35

- Douglas, W.W. (1986) *Br. J. Pharmacol.*, 34, 351-374
- Douglas, J., Civelli, O. and Herbert, E. (1984) *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 665-715
- Douglas, W.W. (1968) *Br. J. Pharmacol.*, 34, 451-474
- Dunlap, K. (1985) *Pflügers Arch.*, 403, 170-174
- Durnam, D.M. and Palmiter, R.D. (1983) *Anal. Biochem.* 131, 385-393
- Eberwine, J. and Roberts, J. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 2166-2170
- Eiden, L.E., Giraud, P., Dave, J.R., Hotchkiss, A.J. and Affolter, H.U. (1984) *Nature*, 312, 661-663
- Fenwick, E.M., Marty, A. and Veher, E. (1982) *J. Physiol.*, 331, 577-635
- Fisher, S.K., Holz, R.W. and Agranoff, B.W. (1981) *J. Neurochem.*, 37, 491-497
- Flexner, J.B., Flexner, L.B. and Stellar, E. (1963) *Science*, 141, 57-59
- Forsberg, E.J., Rojas, E. and Pollard, H.B. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 4915-4920
- Freed, W.J., Morihisa, J.M., Spoor, E., Hoffer, B.J., Olson, L., Seiger, A. and Wyatt, R.J. (1981) *Nature*, 292, 351-352
- French, J.K., Hurst, N.P., Zalewski, P.D., Valente, L. and Forbes, I.J. (1987) *Febs. Lett.*, 212, 242-246
- Friedman, J.E., Lelkes, P.I., Lavie, E., Rosenheck, K., Schneeweis, F. and Schneider, A.S. (1985) *J. Neurochem.*, 44, 1391-1402
- Garcia, A.G., Sala, F., Reig, J.A., Viniegra, S., Frias, J., Fonteriz, R. and Gaudia, L. (1984) *Nature*, 309, 69-71
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. and Kandel, E.R. (1986) *Nature*, 322, 419-422

- Gramsch, C., Meo, T., Riethmüller, G. and Herz, A. (1983) *J. Neurochem.*, 40, 1220-1226
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Green, L.A. (1986) *Science*, 234, 80-83
- Gubler, U., Seeburg, P.H., Hoffman, B.J., Gase, L.P. and Udenfriend S. (1982) *Nature*, 295, 206-208
- Habener, J. (1981) in *Neurosecretion and Brain Peptides*, eds Martin, J.B., Reichlin, S. & Bick, K. (Raven Press, N.Y.) 21-42
- Harper, J.F. and Brooker, G. (1975) *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 1 207-218
- Harris, K.M., Kongsamut, S. and Miller, R. (1986) *Biochem. Biophys Res. Comm.*, 134, 1298-1305
- Hastie, N.D. and Bishop, J.O. (1976) *Cell*, 9, 761-774
- Hess, P. and Tsien, R.W. (1984) *Nature*, 309, 453-456
- Hille, H. (1984) *Ionic Channels in Excitable Membranes* (Sinauer Sunderland, Mass.)
- Höllt, V. (1983) *Trends in Neurosci.*, 6, 24-26
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan B.A. and Morris, H.R. (1975) *Nature*, 258, 755-759
- Ito, S., Nakazato, Y. and Ohga, A. (1979) *Br. J. Pharmacol.*, 65 319-330
- Iversen, L. (1983) *Trends in Neurosci.* 5, 293-295
- Jingami, H., Nakanishi, S., Imura, H. and Numa, S. (1984) *Eur. J Biochem.* 142, 441-447
- Kakidani, A., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y. Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S (1982) *Nature*, 298, 245-249

- Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Banor, S. and Jakobs, K.H.
(1985) *Euro. J. Biochem.*, 151, 431-439
- Kelleher, D.J., Pessin, J.E., Ruoho, A.E. and Johnson, G.L. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4316-4320
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Höllt, and Watson, S.J. (1983) *J. Neurosci.*, 3, 844-855.
- Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1986) *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2, 149-178
- Kidokoro, Y. and Ritchie, A.K. (1980) *J. Physiol.* 307, 199-216
- Kilpatrick, D.L., Slepetis, R. and Kirshner, N. (1981) *J. Neurochem.*, 36, 1245-1255
- Knopf, J.L., Lee, M.H., Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. and Bell, R.M. (1987) *Cell*, 46, 491-502
- Kokobun, J. and Reuter, H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4824-4827
- Kumakura, K., Guidotti, A. and Costa, E. (1979) *Mol. Pharmacol.*, 16, 865-876
- Lamoureux, A. Fancon Bignet, N., Samolyk, D., Pivat, A., Salomon, J.L., Pujol, J.F. and Mallet, J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3881-3885
- Lawrence, J.B. and Singer, R.H. (1985) *Nucleic Acids. Res.*, 13, 1777-1799
- Liston, D.R., Vanderhaeghen, J-J. and Rossier, R. (1983) *Nature*, 302, 62-65
- Livett, B.G., Dean, D.M., Whelan, L.G., Udenfriend, S. and Rossier, J. (1981) *Nature*, 289, 317-319
- Livett, B.G. (1984) *Pysiol. Rev.*, 64, 1103-1106

- Loeffler, J.P., Kley, N., Pittius, C.W. and Höllt, V. (1985) *Endocrinology*, 119, 2840-2847
- Loeffler, J.P., Kley, N., Pittius, C.W. and Höllt, V. (1985) *Neurosci. Lett.*, 62, 383-387
- Majerus, P.W., Wilson, D.B., Conolly, T.M., Bross, T.E. and Neufeld, E.J. (1985) *Trends. Biochem. Sci.*, 10, 168-171
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Mathews, P., Froelich, C.J., Sibbitt, W.L. and Bankhurst, A.D. (1983) *J. Immunol.* 130, 1658-1662
- May, W.S., Sahynoun, N., Wolf, M. and Cuatrecasas, P. (1985) *Nature*, 317, 549-551
- McMaster, G.K. and Carmichael, G.G. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4835-4838
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebayliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, S. and Green, M.R. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12, 7035-7056
- Messing, J. and Vieira, J. (1982) *Gene*, 19, 269-276
- Messing, R.O., Carpenter, C.L. and Greenberg, D.A. (1986) *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 136, 1049-1056
- Millan, M.J. and Herz, A. (1985) *Int. Rev. Neurobiol.*, 26, 1-83
- Miller, R. (1984) *Trends in Neurosci.*, 7, 184-185
- Miller, R.J. (1986), *Trends in Neurosci.*, 9, 538-541
- Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R. and Schacher, S. (1986) *Science*, 234, 1249-1254
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C. and Cohen, S.N. and Numa, S. (1979) *Nature*, 278, 423-427

- Naujoks, K.W., Korsching, S., Rohrer, H. and Thoenen, H. (1982) *Dev. Biol.*, 92, 365-379
- Nishizuka, Y. (1984) *Nature*, 308, 693-698
- Noble, E.P., Bommer, M., Sincini, E., Costa, T. and Herz, A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 135, 566-573
- Noda, M., Furitani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S. (1982) *Nature*, 295, 202-206
- Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Imagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T. and Hidaka, H. (1987) *Nature*, 325, 161-166
- Orellana, S., Solski, P. and Brown, J.H. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 1638-1643
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) *Science*, 233, 853-859
- Pittius, C.W., Kley, N., Loeffler, J.P. and Höllt (1985) *EMBO J.*, 4, 1257-1260
- Pittius, C.W., Kley, N., Loeffler, J.P. and Höllt, V. (1987) *J. Neurochem.* ,
- Prell, G.D. and Green, J.P. (1984) *Ann. Rev. Neurosci.*, 9, 209-255
- Quach, T.T., Tang, F., Viageyama, H., Mocchetti, I., Guidotti, A., Meek, G.L., Costa, E. and Schwartz, Y.P. (1984) *Molec. Pharmacol.*, 26, 225-260
- Rasmussen, H. and Barrett, P.Q. (1984) *Physiol. Rev.*, 64, 938-985
- Rane, S.G. and Dunlap, K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 184-188

- Rosen, J.M. and Monahan, J. (1982) in Schrader, W.T., and O'Malley B.W. (eds.) Laboratory methods manual for hormone action and molecular endocrinology. Texas Medical Center, Houston, TX., p. 4-1, 4-69
- Rosenthal, W. and Schultz, G. (1987) Trends in Neurosci., 8, 351-354
- Saadat, S., Stehle, A.D., Lamouroux, A., Mallet, J. and Thoenen, H. (1987) J. Biol. Chem., 262, 13007-130014
- Sagen, J., Pappas, G.D. and Pollard, H.B. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 83, 7522-7526
- Schubert, D., LaCorbiere, M., Whitlock, C. and Stallcup, W. (1978) Nature, 273, 297-308
- Schwartz, J.C., Barbin, G., Duchemin, A.M., Garbarg, M., Palacios J.D., Quach, T.T. and Rose, C. (1980) in Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones (eds. Pepen, G; Kuhar M.J., Enna, S.J.) p. 169-182 (Raven Press, N.Y.).
- Schwartz, J.P. and Costa, E. (1986) Ann. Rev. Neurosci., 9, 277-305
- Schwartz, J.H. and Greenberg, S.M. (1987) Ann. Rev. Neurosci., 10 459-476
- Seizinger, G.R., Grimm, C., Höllt, and Herz, A. (1984) J. Neurochem., 42, 447-457
- Steiner, D.F., Quinn, P.S., Chan, S.J. Narsh, J. and Tager, H.S. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. 343, 1-16
- Suprenant, A. (1982) J. Cell. Biol., 95, 559-566
- Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleic. Acids Res., 5, 2721-2728
- Taylor, C.W. (1986) Trend Pharm. Sci., 7, 467-471
- Thoenen, H. Biochem. Soc. Symp. (1987) 36, 3-15
- Trifaro, J.M. and Lee, R.W.H. (1980) Neuroscience, 5, 1553-1546

- Udenfriend, S. and Kilpatrick, D.L. (1983) Arch. Biochem. Biophys.
221, 309-323
- Uhl, G., Zingg, H., and Habener, J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA; 82, 5555-5559
- Unsicker, K. and Hofman, H.D. (1983) Dev. Brain Res., 7, 41-52
- Unsicker, K., Hofman, H.D., Hohne, I., Müller, T.H. and Schmidt, R.
(1983) Dev. Brain. Res., 9, 369-379
- Unsicker, K., Griesser, G.H., Lindmar, R., Loeffelholz, K. and Wolf,
U. (1980) Neuroscience, 5, 1445-1460
- Viveros, O.H., Diliberto, E.J. Hazum, E. and Chang, K.J. (1979) Mol.
Pharmacol., 16, 1101-1108
- Wade, A., Yashima, N., Izumi, F., Kobayashi, H. and Yanagihara, N.
(1984) Neurosci. Lett., 47, 75-80
- Wahl, G.M., Stern, M. and Stark, G.R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 76, 3683-3687
- Washek, J.A., Dave, J.R., Eskay, R.L. and Eiden, L.E. (1987)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 146, 495-501
- Williamson, J.R. and Hansen, C.H. (1987) in Biochemical Actions of
Hormones, vol. 14 (Academic Press, Inc.) eds. Litwack, G., 14,
29-80
- Wolf, M., Levine, H., Stratford, , Nay, W.jr., Cuatrecasas, P. and
Sahynoun, N. (1985) Nature 317, 546-549
- Yoshikawa, K., Williams, C. and Sabol, S. (1984) J. Biol. Chem.,
259, 14301-14308

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie unter der Leitung von Prof. A. Herz ausgeführt, dem ich hiermit für die Überlassung des Themas, und seine großzügige und verständnisvolle Förderung der vorliegenden Arbeit herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank für die lebhafteste Teilnahme, Beratung und ausführlichen Diskussionen gilt Herrn Prof. V. Höllt, sowie Herrn Dr. J.Ph. Loeffler, C.W. Pittius und T. Costa.

Teile dieser Arbeit wurden in Kollaboration mit anderen Mitarbeitern durchgeführt - die Verteilungsstudien der PENK-mRNA im zentralen Nervensystem mit Dr. C.W. Pittius, die In-situ-Hybridisierung mit Dr. B. Morris, die cAMP Radioimmunoassays mit Dr. T. Costa, denen ich hiermit meinen Dank aussprechen möchte.

Zuletzt, aber nicht minder herzlich, danke ich Frau U. Bäuerle für die Fertigstellung der Zeichnungen und Frau I. Döhle und Frau H. Roth für die Fertigstellung des Manuskriptes.

Lebenslauf

Nikolai A. Kley

08. Mai 1961: geboren in Varese/Italien als Sohn von Dr. Walter Kley und Frau Irene Kley, geborene Nissel.
- Ab September 1967: Volksschule und Oberschule an der Europäischen Schule in Varese (Italien)
- Juni 1979: Abitur (Europäisches Baccalaureate)
- Oktober 1979-
Juli 1983: Studium im Fach Biochemie und Physiologie an der University of Leeds (England)
- Oktober 1983-
Januar 1987: Ausführung der vorliegenden Promotionsarbeit in der Abteilung für Neuropharmakologie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, Martinsried/München
- Ab Januar 1987: Stipendiat am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried/München.

1. Pittius, C.W., Kley, N., Loeffler, J.Ph., and Höllt, V.: Quantitation of proenkephalin A messenger RNA in bovine brain, pituitary and adrenal medulla: correlation between mRNA and peptide levels (1985) EMBO J., 4, 1257-1260
2. Loeffler, J.Ph., Kley, N., Pittius, C.W., and Höllt, V.: γ -Aminobutyric acid decreases levels of messenger ribonucleic acid encoding prolactin in the rat pituitary (1985) Neurosci. Lett., 53, 121-125
3. Loeffler, J.Ph., Kley, N., Pittius, C.W., and Höllt, V.: Corticotropin-releasing factor and forskolin increase Proopiomelanocortin messenger RNA levels in rat anterior and intermediate cells in vitro (1985) Neurosci. Lett., 62, 383-387
4. Kley, N., Loeffler, J.Ph., Pittius, C.W., and Höllt, V.: Proenkephalin A gene expression in bovine adrenal chromaffin cells is regulated by changes in electrical activity (1986) EMBO J., 5, 967-970
5. Loeffler, J.Ph., Kley, N., Pittius, C.W., and Höllt, V.: Calcium ion and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in rat intermediate and anterior pituitary lobes (1986) Endocrinology, 119, 2840-2847
6. Loeffler, J.Ph., Kley, N., Pittius, C.W., Almeida, O.F.X., and Höllt, V.: In vivo and in vitro studies of GABA-ergic inhibition of prolactin biosynthesis (1986) Neuroendocrinology, 43, 504-510

7. Loeffler, J.Ph., Demeneix, B.A., Pittius, C.W., Kley, N., Haegele, K.D., and Höllt, V.: GABA differentially regulates the gene expression of proopiomelanocortin in rat intermediate and anterior pituitary (1986) Peptides 7, 253-258
8. Taleb, O., Loeffler, J.Ph., Trouslard, J., Demeneix, B.A., Kley, N., Höllt, V., and Feltz, P.: Ionic conductances related to GABA action on secretory and biosynthetic activities of pars intermedia cells (1986) Brain Res. Bull., 17, 725-730
9. Pittius, C.W., Kley, N., Loeffler, J.Ph., and Höllt, V.: Proenkephalin B messenger RNA in porcine tissues: Characterization, quantification, and correlation with opioid peptides (1987) J. Neurochem., 48, 586-592
10. Kley, N., Loeffler, J.Ph., Pittius, C.W., and Höllt, V.: Involvement of ion channels in the induction of proenkephalin A gene expression by nicotine and cAMP in bovine chromaffin cells (1987) J. Biol. Chem., 262, 4084-4089
11. Kley, N., Loeffler, J.Ph., and Höllt, V.: Ca^{2+} dependent histaminergic regulation of proenkephalin mRNA levels in cultured adrenal chromaffin cells (1987) Neuroendocrinology 46, 89-92
12. Bommer, M., Liebis, D., Kley, N., Herz, A., and Noble, E.P.: Histamine affects release and biosynthesis of opioid peptides primarily via H_1 -receptors (1987) J. Neurochem., 49, 1688-1696

13. Loeffler, J.Ph., Demeneix, B.A., Kley, N., and Höllt, V.:
Dopamine inhibition of proopiomelanocortin gene expression
in the intermediate lobe of the pituitary: interactions
with corticotropin releasing factor and the β -adrenergic
receptors and the adenylate cyclase system (1988)
Neuroendocrinology, 47, 95-101
14. Kley, N.: Multiple regulation of proenkephalin gene
expression by protein kinase C (1988) J. Biol. Chem.,
263, 2003-2008.

